

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

OZIMO PEREIRA GAMA FILHO

**EFEITO DA IMUNOSSUPRESSÃO COM TACROLIMUS NA REGENERAÇÃO
HEPÁTICA EM RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA PARCIAL**

CURITIBA
2009

OZIMO PEREIRA GAMA FILHO

**EFEITO DA IMUNOSSUPRESSÃO COM TACROLIMUS NA REGENERAÇÃO
HEPÁTICA EM RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA PARCIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

CURITIBA
2009

GAMA FILHO, OZIMO PEREIRA

Efeito da imunossupressão com Tacrolimus na regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia parcial. / Ozimo Pereira Gama Filho. - Curitiba, 2009.
63 f: 21 Il.; 5 tab.

Orientador: Jorge Eduardo Fouto Matias

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica.

1. Fígado - Regeneração. 2. Fígado - Transplante. 3. Fígado – Cirurgia. 4. Tacrolimus. I. Matias, Jorge Eduardo Fouto. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. III. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA DA AVALIAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno **OZIMO PEREIRA GAMA FILHO**

Título da Dissertação: EFEITO DA IMUNOSSUPRESSÃO COM TACROLIMUS NA
REGENERAÇÃO HEPÁTICA EM RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA
PARCIAL.

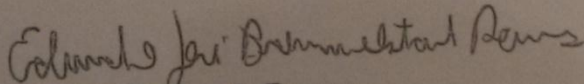
CONCEITOS EMITIDOS:

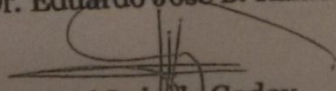
Prof. Dr. Eduardo Jose B. Ramos	conceito A	equivalência 9.5
Prof. Dr. José Luiz de Godoy	conceito A	equivalência 9.5
Prof. Dr. Alexandre C. T. de Freitas	conceito A	equivalência 9.5

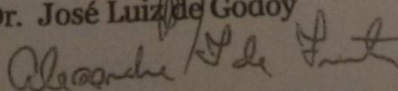
CONCEITO FINAL DE AVALIAÇÃO:

Conceito: A Equivalência: 9.5

Curitiba, 04 de dezembro de 2009.


Prof. Dr. Eduardo Jose B. Ramos


Prof. Dr. José Luiz de Godoy


Prof. Dr. Alexandre C. T. de Freitas

Aos meus pais e meus irmãos,
pelo amor incondicional sempre recebido e pela inabalável apoio fornecido para
realização deste trabalho.

À Flávia Serra, apaixonante esposa e grande amor da minha vida, por ajudar a
construir nossa vida, pela compreensão da ausência,
estímulo constante nos momentos mais difíceis e auxílio na realização deste
trabalho.

Aos Professores, pela confiança e pelo exemplo de dedicação à pesquisa na área
médica.

AGRADECIMENTOS

MUITO OBRIGADO! Este afetuoso agradecimento aos amigos construídos nesta Pós-Graduação pelos valiosos momentos de companheirismo vividos, e aos que se mantiveram presentes em todos os momentos da elaboração deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS,**

- Orientador deste trabalho, pelos preciosos ensinamentos, estímulo de amigo e apoio constante nas várias etapas desta tese.

Ao **Prof. Dr. ANTÔNIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS,**

- Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Princípios da Cirurgia da Faculdade Evangélica do Paraná, meu reconhecimento e gratidão pela acolhida, apoio e estímulo.

Aos **amigos GIORGIO BARETTA E EDMAR TODERK,**

- pelo auxílio na realização das diversas etapas desta tese e por estar junto em todas as fases da realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. JÚLIO CESAR UILI COELHO,**

- Ilmo Professor, seu exemplo como médico é marcante na minha escolha pela Cirurgia do Aparelho Digestivo. Seu vasto conhecimento e incansável trabalho para melhorar a formação acadêmica dos seus alunos são essenciais no reconhecimento desta especialidade.

Aos alunos, professores e demais funcionários da disciplina de Cirurgia Experimental e do Biotério da UFPR,

- pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos, dosagens bioquímicas, auxílio no manejo dos animais e disponibilização dos artigos médicos utilizados neste trabalho.

"O entusiasmo é a maior força da alma.
Conserva-o e nunca te faltará poder para
consequires o que desejas."

Napoleão Bonaparte

RESUMO

EFEITO DA IMUNOSSUPRESSÃO COM TACROLIMUS NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA EM RATOS SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA PARCIAL

Objetivo: Avaliar em dois momentos distintos da regeneração hepática a influência do Tacrolimus sobre o fenômeno da regeneração hepática desencadeada pela ressecção de 70% do parênquima hepático em ratos plenamente desenvolvidos. **Métodos:** Utilizaram-se 40 ratos Wistar com peso médio de 510,08 g \pm 11.66 g distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 20, cada grupo subdividido em dois subgrupos conforme o dia da morte após a hepatectomia. De acordo com o grupo os animais receberam por gavagem solução aquosa de Tacrolimus 0,1 mg/kg/dia ou solução salina no mesmo volume. Após três dias de pré-terapia todos foram submetidos à hepatectomia de 70% pela ressecção dos lobos hepáticos mediano e lateral esquerdo que foram pesados para posterior cálculo da regeneração hepática pela fórmula de Kwon. Vinte e quatro horas ou sete dias após a hepatectomia, 10 animais de cada grupo foram mortos, os fígados remanescentes (regenerados) foram pesados e amostrados para realização de índice mitótico por hematoxilina-eosina e estudo imunoistoquímico com os marcadores PCNA e Ki-67. **Resultados:** Os animais que receberam tacrolimus mostraram índice maior de regeneração hepática, atingindo significância estatística quando comparado ao subgrupo de animais mantidos com placebo quando analisados pelos parâmetros: fórmula de Kwon, índice mitótico e marcador PCNA. A tendência para o marcador Ki-67 foi idêntica aos outros parâmetros mas não alcançou significância estatística. **Conclusão:** A imunossupressão com tacrolimus possui efeito estimulatório no processo de regeneração hepática desencadeado pela hepatectomia 70% em ratos Wistar adultos, plenamente desenvolvidos.

PALAVRAS-CHAVE: 1. Tacrolimus; 2. Hepatectomia; 3. Regeneração hepática.

ABSTRACT

EFFECT OF IMMUNOSUPPRESSION WITH TACROLIMUS IN LIVER REGENERATION IN RATS UNDERGOING PARTIAL HEPATECTOMY

Objective: To analyze, during two different moments of liver regeneration, the effect of the immunosuppressant Tacrolimus on the 70% hepatectomy model-induced liver regeneration in adult rats. Methods: Forty Wistar adult rats, weighing 510.08 ±11.66 g were randomly divided into two groups, each group divided into two subgroups according to the death day after 70% hepatectomy. According to the group of study, rats received 0.1mg/Kg/day of Tacrolimus or the same volume of saline solution, by gavage. After three days of pre-therapy, all animals were submitted to 70% hepatectomy by resection of median and left lateral hepatic lobes which were weighed for posterior calculation of liver regeneration by Kwon's formula. Twenty four hours or seven days after hepatectomy ten rats of each group were killed; the remaining liver (regenerated) was entirely resected, weighed and sampled for mitotic index on hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical assays with PCNA and Ki-67 markers. Data were statistically analyzed by Mann-Whitney or Student "t" tests, with significance level of 5% ($p < 0.05$). Results: Rats receiving tacrolimus showed statistically significant higher levels of liver regeneration when compared to placebo according to Kwon's formula, mitotic index and PCNA marker. Identical trend was found with Ki-67 marker, but without statistical significance. Conclusion: Tacrolimus-based immunosuppression has stimulatory effect on liver regeneration process induced by 70% hepatectomy in adult Wistar rats.

KEY WORDS: 1.Tacrolimus; 2.Hepatectomy; 3.Liver regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – LOBOS HEPÁTICOS.....	17
FIGURA 2 – LÓBULO HEPÁTICO	19
FIGURA 3 – MECANISMOS CELULARES	20
FIGURA 4 – PROLIFERAÇÃO CELULAR X TEMPO	20
FIGURA 5 – MECANISMOS MOLECULARES	21
FIGURA 6 – CITOCINAS – FATORES DE CRESCIMENTO	22
FIGURA 7 – CITOCINAS	23
FIGURA 8 – MECANISMOS GENÉTICOS	24
FIGURA 9 – ADMINISTRAÇÃO DA DROGA: (A) APREENSÃO DO RATO SEDADO E REALIZAÇÃO DE SONDAGEM OROGÁSTRICA COM CÂNULA PLÁSTICA RÍGIDA; (B) ADMINISTRAÇÃO DO VOLUME DE MEDICAÇÃO PREVIAMENTE ASPIRADO NA SERINGA	33
FIGURA 10 – TRICOTOMIA DA REGIÃO VENTRAL COM APARELHO DE TOSA, SOB EFEITO DE ANESTESIA	34
FIGURA 11 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: (A) VISÃO DO FÍGADO; (B) LIBERAÇÃO DOS LIGAMENTOS CIRCUNDANTES DO FÍGADO; (C) IDENTIFICAÇÃO DOS LOBOS A SEREM RESSECADOS.....	34
FIGURA 12 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: (D) LIGADURA DOS LOBOS LATERAL ESQUERDO E MEDIANO; (E) VISÃO FRONTAL DA LIGADURA; (F) ASPECTO FINAL APÓS A RESSECÇÃO DE 70% DA MASSA HEPÁTICA.....	35
FIGURA 13 – RESSECÇÃO DO FÍGADO REGENERADO NO 1º OU 7º DIA APÓS HEPATECTOMIA À 70%: (A) MORTE POR DOSE LETAL DE ÉTER EM CAMPÂNULA DE VIDRO; (B) ABERTURA DA LAPAROTOMIA PRÉVIA	36

FIGURA 14 – RESSECÇÃO DO FÍGADO REGENERADO NO 1º OU 7º DIA APÓS HEPATECTOMIA À 70%: (A) LIBERAÇÃO DAS ADERÊNCIAS; (B) IDENTIFICAÇÃO DOS LOBOS REMANESCENTES COM SECÇÃO DE SUA VASCULARIZAÇÃO; (C) PEÇA HEPÁTICA REGENERADA RESSECADA	37
FIGURA 15 – (A e B) FOTOMICROGRAFIA REVELANDO FIGURAS DE MITOSE (SETAS) (HE, X400)	39
FIGURA 16 – (A e B) FOTOMICROGRAFIA REVELANDO POSITIVIDADE NUCLEAR PARA PCNA (SETAS) (IMUNOISTOQUÍMICA, X400)	40
FIGURA 17 – FOTOMICROGRAFIA REVELANDO POSITIVIDADE NUCLEAR PARA Ki-67 (A) E NEGATIVIDADE PARA Ki-67 (B) (SETAS) (IMUNOISTOQUÍMICA, X400)	41
GRÁFICO 1 – MÉDIA DOS PESOS INICIAL E NA MORTE EM CADA GRUPO ± DESVIO PADRÃO. C.24h: GRUPO CONTROLE 24 HORAS; C.7d: GRUPO CONTROLE 7 DIAS; E.24h: GRUPO ESTUDO 24 HORAS; E.7d: GRUPO ESTUDO 7 DIAS; PCI: PESO CORPORAL INICIAL; PCM: PESO CORPORAL NA MORTE. COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE OS GRUPOS (<i>p</i>)	43
GRÁFICO 2 – AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON. COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS INTRAGRUPOS. COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS (24H x 7D) (<i>p</i>).....	45
GRÁFICO 3 – AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON. COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS INTERGRUPOS. COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS (24H x 7D) (<i>p</i>).....	46
GRÁFICO 4 – AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA INTRA E INTERGRUPOS ATRAVÉS DO ÍNDICE MITÓTICO. COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS (<i>p</i>)	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1– ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA VARIAÇÃO DOS PESOS CORPORAIS INICIAL E NO DIA DA MORTE DENTRO DOS SUBGRUPOS CONTROLE 24 HORAS E 7 DIAS E SUBGRUPOS ESTUDO 24 HORAS E 7 DIAS	44
TABELA 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA INTERGRUPOS (CONTROLE X ESTUDO) DAS MÉDIAS DO PESO CORPORAL INICIAL E NO DIA DA MORTE NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS	44
TABELA 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO PESO ESTIMADO DO FÍGADO RESSECADO, PESO ESTIMADO DO FÍGADO RESTANTE E DO PESO TOTAL ESTIMADO DO FÍGADO NO DIA DA HEPATECTOMIA ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ESTUDO NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS.....	45
TABELA 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA PORCENTAGEM DO PCNA INTRA E INTERGRUPOS NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS	48
TABELA 5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA PORCENTAGEM DO Ki67 INTRA E INTERGRUPOS NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 REGENERAÇÃO HEPÁTICA	16
2.1.1 Aspectos históricos	16
2.1.2 Modelos experimentais de regeneração hepática	16
2.1.3 Mecanismos funcionais	17
2.1.4 Mecanismos celulares	18
2.1.5 Mecanismos moleculares	21
2.1.6 Mecanismos genéticos	23
2.2 FATORES CLÍNICOS RELACIONADOS COM A REGENERAÇÃO HEPÁTICA	24
2.2.1 Cirrose	24
2.2.2 Esteatose	25
2.2.3 Idade	25
2.2.4 Resposta metabólica	25
2.3 PROCESSO REGENERATIVO E TRANSPLANTE HEPÁTICO	26
2.3.1 Lesão isquêmica	26
2.3.2 Massa hepática	26
2.3.3 Imunosupressores	27
2.3.3.1 Ação do Tacrolimus (FK506) na regeneração hepática	27
3 MATERIAL E MÉTODO	30
3.1 COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA	30
3.2 ANIMAIS	30
3.3 AMBIENTE E ALIMENTAÇÃO	30
3.4 GRUPOS	31
3.5 PESAGEM DOS ANIMAIS	31
3.6 ADMINISTRAÇÃO DE TACROLIMUS E SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA	31
3.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	33
3.8 MORTE	35

3.9 ANÁLISE DO PESO CORPORAL.....	37
3.10 ANÁLISE DO PESO DO FÍGADO RESSECADO E REGENERADO.....	37
3.11 CÁLCULO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON.....	38
3.12 DETERMINAÇÃO DA REGENERAÇÃO PELO ÍNDICE MITÓTICO (HE)	38
3.13 COLORAÇÃO PELA IMUNOHISTOQUÍMICA COM PCNA.....	39
3.14 COLORAÇÃO PELA IMUNOISTOQUÍMICA COM KI-67	40
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 PESOS DOS ANIMAIS.....	43
4.2 PESOS DO FÍGADO	44
4.3 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON	45
4.4 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO ÍNDICE MITÓTICO	46
4.5 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO PCNA	47
4.6 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO Ki-67	48
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICES	60
ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

O fígado ocupa uma posição estratégica entre o trato gastrointestinal e o resto do organismo, sendo crucial para a manutenção da homeostase metabólica, através do metabolismo dos aminoácidos, carboidrato, lipídeos e vitaminas; além da fagocitose de partículas provenientes da circulação portal; síntese protéica; biotransformação de metabólitos circulantes; detoxificação e excreção de produtos endógenos (CRAWFORD, 1994).

A reprodução celular hepática é estável e capaz de regeneração no organismo adulto. Lesões hepáticas de origem variada, incluindo agentes físicos, químicos ou infecciosos, levam os remanescentes celulares a proliferar numa tentativa de restabelecer a integridade estrutural do órgão, constituindo o fenômeno da regeneração hepática (GODOY, 2006).

A complexidade de suas funções é representada por sua dupla vascularização sanguínea: esplâncnica, a partir da veia porta e arterial sistêmica, a partir do tronco celíaco. Apresenta extraordinária pluralidade funcional, destacando-se no controle da produção de energia e excreção de compostos endógenos ou exógenos circulantes (MEYERS, 1991).

O termo regeneração (do latim *regenerare*) significa “formar-se de novo” (AURÉLIO, 1986), torna-se biologicamente incorreto quando utilizado para a resposta induzida pelo dano tecidual hepático. Pois ocorre uma hiperplasia e hipertrofia compensatória do tecido remanescente, até o restabelecimento da massa hepática primitiva, dessa forma os lóbulos ressecados ou destruídos não são recuperados (FAUSTO, 2005).

No fígado normal, os hepatócitos em fase de mitose são raros, havendo um hepatócito em mitose para cada 20000 mil examinados (STEER, 1995), ou seja, as maiorias das células estão na fase G0 do ciclo celular ou fase de repouso. Sob certos estímulos as células parenquimatosas e não parenquimatosas passarão pelas 04 fases do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) restabelecendo a relação normal entre peso do fígado / peso do corpo, sendo este alcançado em três meses nos humanos e em 7 a 10 dias no rato (COURT, 2002). Múltiplos fatores têm sido implicados na regulação desta resposta regenerativa, incluindo fatores de crescimento, fatores de transcrição e seus respectivos genes-alvo, hormônios e citosinas. No entanto, vários aspectos da participação efetiva de cada um desses fatores ainda requerem esclarecimentos (KONIARIS, 2003).

O modelo experimental mais amplamente utilizado para o estudo da regeneração hepática, introduzido por Higgins & Anderson, é a hepatectomia parcial (HP) com retirada de 2/3 do parênquima hepático de ratos, o que perfaz cerca de 70% da massa hepática total desses animais. Os avanços da cirurgia hepática, em especial do transplante de fígado em suas várias modalidades, tornaram o estudo da regeneração hepática ainda mais importantes uma vez que o sucesso desta forma de tratamento está relacionado com a capacidade regenerativa do órgão (COELHO, 2008).

Devido à relevância dos fenômenos regenerativos no implante hepático e a possibilidade de interferência de múltiplos fatores, se desperta o interesse pelo estudo das drogas imunossupressoras na regeneração hepática, pois tais drogas constituem a base do tratamento após o transplante de órgãos sólidos (FRANCAVILLA, 1990a). Vários estudos experimentais têm demonstrado que os inibidores da calcineurina, em especial o Tacrolimus ou FK 560 estimulam o processo de regeneração por via imunológica e não imunológica (FRANCAVILLA, 1991b; TAMURA, 1998).

1.1 OBJETIVOS

Este estudo foi desenhado para avaliar, em dois momentos distintos da regeneração hepática, a influência do Tacrolimus sobre o fenômeno da regeneração hepática desencadeada pela ressecção de 70% do parênquima hepático em ratos plenamente desenvolvidos, através dos seguintes objetivos:

- a. Determinar, utilizando o peso corporal, pesos da massa hepática ressecada e do fígado regenerado, a porcentagem de regeneração hepática 24 horas e sete dias após a hepatectomia 70%;
- b. Determinar o índice mitótico observado em histologia convencional com hematoxilina e eosina 24 horas e sete dias após hepatectomia a 70%;
- c. Determinar por dois métodos imunoistoquímicos de proliferação celular (Ki-67 e PCNA) a proliferação dos hepatócitos nesses dois momentos;
- d. Correlacionar comparativamente a regeneração hepática determinada por cada método utilizado e avaliar se o imunossupressor tacrolimus altera a regeneração hepática em ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 REGENERAÇÃO HEPÁTICA

2.1.1 Aspectos Históricos

A capacidade regenerativa do fígado é descrita desde a antiguidade, o poema grego de Ésquilo, no século VIII a.C. descreve o mito de Prometeu. O titã da magia ao roubar o fogo dos deuses e entregar aos homens, foi condenado por Zeus a permanecer acorrentado a uma rocha na montanha do Cáucaso, seu fígado era devorado por uma águia, que ao voltar no dia seguinte encontrava a víscera íntegra (POWER, 2008). Contudo a documentação científica foi realizada somente em 1890 (KONIARIS, 2003).

2.1.2 Modelos Experimentais de Regeneração Hepática

A maioria das informações a cerca da proliferação dos hepatócitos é derivada do estudo de modelos animais, principalmente os ratos, *in vivo* ou da cultura de hepatócitos *in vitro* (FRANCAVILLA A, 1994c). Estudos sobre a regeneração hepática em humanos apresentam obstáculos éticos e uma heterogeneidade etiológica da lesão hepática que precede a regeneração. Com isso a investigação da regeneração é padronizada em modelos experimentais (PALMES, 2004).

Os hepatócitos podem ser isolados pela perfusão *in situ* com collagenases seguidas de sua separação das outras células, e dessa forma cultivados *in vitro*. Este método é preferencialmente aplicado para estudo de fatores de crescimento humorais (SEGLEN, 1976; KLAUNIG, 1981). A cultura de hepatócitos *in vitro* foi responsável pelo reconhecimento da importante interação das células não parenquimatosas e os hepatócitos para ocorrer à completa regeneração funcional hepática (LA BRECQUE, 1994).

Higgins & Anderson em 1931 foram os pioneiros no estudo da regeneração hepática em ratos e seu trabalho ficou marcado pela padronização do método da hepatectomia parcial á 70% que reduz a massa hepática sem, contudo ocasionar grandes danos celulares. A indução da regeneração após hepatectomia parcial á 70% depende da redução funcional da massa hepática.

Em ratos a massa hepática corresponde á 4% da massa corpórea, os lobos hepáticos apresentam proporções constantes, nutridos por uma tríade portal, assim

distribuídos: lateral esquerdo – 30%, mediano - 40%, superior direito – 13%, inferior direito – 6% e caudado – 7% (MADRAHIMOV, 2006) (FIGURA 1).

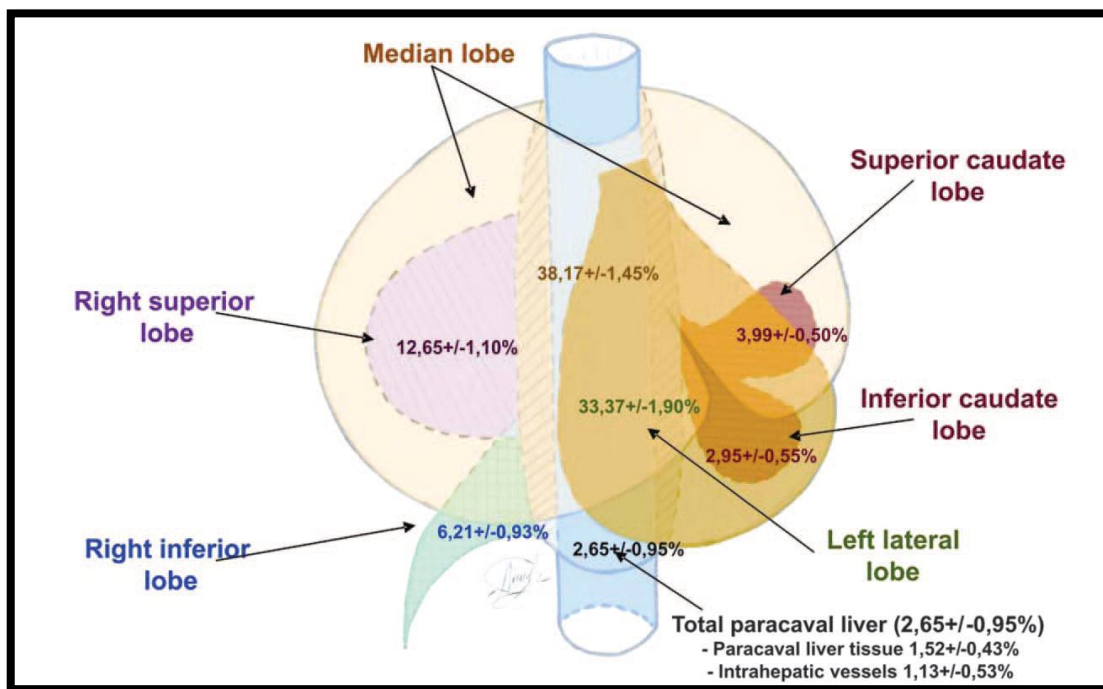


FIGURA 1: LOBOS HEPÁTICOS (MADRAHIMOV, 2006)

Neste experimento a massa hepática é regenerada dentro de uma semana, com toda a resposta proliferativa ocorrendo nos primeiros três dias. Há a indução da proliferação de 95% dos hepatócitos, com início da replicação de DNA dentro de 14 horas e a proliferação pericentral ocorre em aproximadamente 36 – 48 horas. As células não parenquimatosas iniciam sua proliferação 24 horas após os hepatócitos (GRISHAM, 1962).

Os hepatócitos remanescentes, apesar de receberem um aumento relativo do fluxo portal, sofrem o processo de regeneração hepática puro não acompanhado de injúria celular associada (COURT, 2002). Este método é tecnicamente de fácil aprendizagem, apresenta custos operacionais reduzidos, largamente reproduzíveis e com baixa mortalidade. A utilização de ratos conta ainda com a vantagem da possibilidade de manipulação genética e recombinação homóloga (FAUSTO, 2005).

2.1.3 Mecanismos Funcionais

O fígado funcionalmente regenerado deve ser capaz de manter a glicemia sanguínea, realizar síntese protéica, manter as vias de desintoxicação funcionais e

secretar bile. Alguns fatores, contudo impedem esta plena recuperação, sendo os mais citados: a extensão da ressecção ou dano hepático, doenças parenquimatosas pré-existentes, a idade e a pressão portal (EZAKI, 1998). Nos modelos animais, a síntese de DNA começa 12-16h após a HP á 70% e alcança seu pico 24-48h. As figuras de mitose já podem ser identificadas 6-8h após o procedimento e atingem seu máximo em 48h de pós-operatório (KONTOURAS, 2001).

A regeneração funcional geralmente é re-estabelecida em torno do 8^a ao 10^a dia de pós-operatório nos modelos animais e de dois a três semanas em pacientes com fígado saudável (KONIARIS, 2003). Há uma mistura de hipertrofia (aumento do tamanho celular ou conteúdo protéico na fase pré-replicativa) e hiperplasia (aumento do número de células) devolvendo volume hepático funcional que corresponde a 2,5% da massa corpórea (VANTHIEL, 1987).

O potencial regenerativo hepático é limitado. Observações clínicas e estudos experimentais determinaram um limite superior para as ressecções hepáticas simples, em torno de 70-80% em humanos e 95% em ratos. Caso ocorra regeneração funcional total, uma nova ressecção de no máximo 50% poderá ser tolerada. Estes limites são diretamente relacionados à reserva funcional do fígado e as condições dos organismos (PETROWISKY, 2002; SAITO, 2006).

2.1.4 Mecanismos Celulares

Aproximadamente 60% do tecido hepático são compostos por hepatócitos. Estes se juntam de forma hexagonal e são entrecortados por uma veia centrolubular na porção central e pela tríade portal (arteríola hepática, vênula porta e ducto biliar) nos vértices, formando assim o lóbulo hepático que é considerado a unidade anatomofuncional (SHERLOCK, 1985). O hepatócito possui três superfícies: uma voltada para o sinusóide, à segunda voltada para o canalículo biliar e a outra para os hepatócitos vizinhos. Não possui membrana basal. Os sinusóides estão revestidos por células endoteliais associadas a células fagocíticas (células de Kupffer) e as células estreladas (células de Ito) (FIGURA 2).

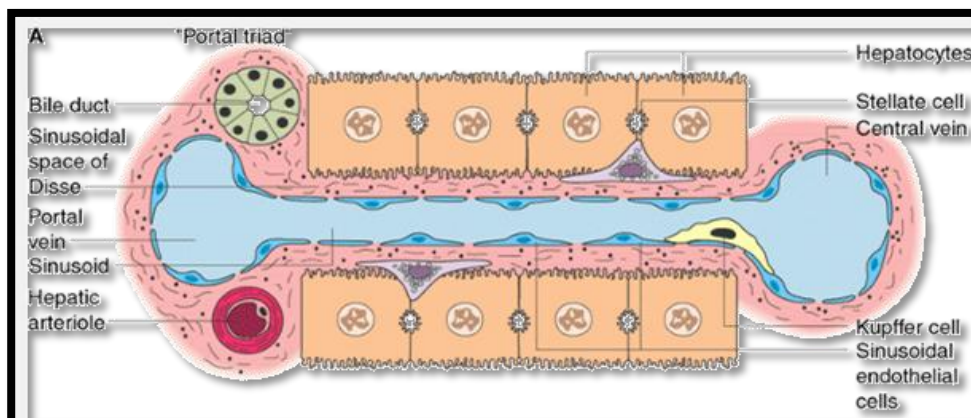


FIGURA 2: LÓBULO HEPÁTICO (SHERLOCK, 1985).

O processo de regeneração hepática envolve basicamente a ativação do hepatócito adulto e de células progenitoras (*stem cells*) (KOUNTOURAS, 2001; FAUSTO, 2005) encontradas no espaço sinusoidal e na medula óssea. Estas são representadas por células epiteliais com núcleos ovais que são capazes de transformar-se em epitélio biliar e novos hepatócitos (MASSON, 2004).

Contudo após hepatectomia parcial em ratos o processo regenerativo envolve principalmente a participação dos hepatócitos com o auxílio das células não parenquimatosas (GRISHAM, 1962). A ativação dos hepatócitos quiescentes segue uma seqüência conhecida como: *priming* ou iniciação, proliferação e finalização. As citocinas e os fatores de crescimentos são os responsáveis pelo início e continuidade do processo (ZIMMERMANN, 2002) (FIGURA 3).

No fígado normal a maioria dos hepatócitos está na fase G0 ou quiescentes, após hepatectomia parcial 70 - 95% dos hepatócitos sofrem transição para fase G1, dependendo da idade do animal (FAUSTO, 2005). A fase S ou de síntese de DNA começa de 12 – 15 horas após a ressecção e a fase G2/M após 6 – 8 horas da síntese de DNA (LA BRECQUE, 1994).

As células não parenquimatosas apresentam pico de proliferação 12 horas após a proliferação dos hepatócitos e nas hepatectomia parciais maiores que 50% uma segunda onda de proliferação dos hepatócitos pode ser identificada entre o 3ª e o 5ª dias (KONIARIS, 2003) (FIGURA 4).

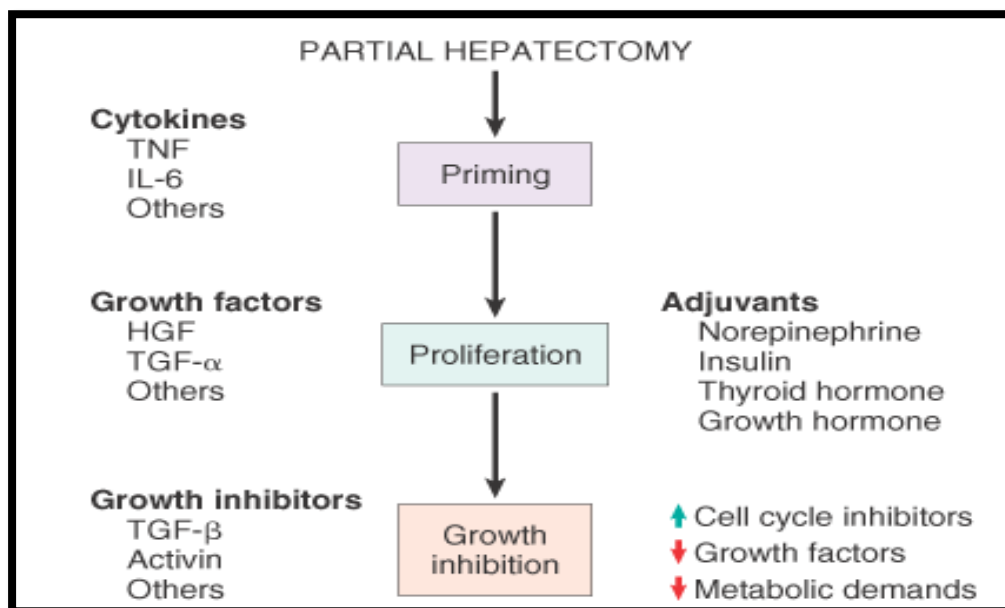


FIGURA 3: MECANISMOS CELULARES (ZIMMERMANN, 2002)

A proliferação dos hepatócitos após hepatectomia parcial começa na região periportal (zona 1) e continua para região pericentral (Zona 3), no 3^a dia após a hepatectomia parcial a histologia caracteriza-se por agrupamentos de hepatócitos ao longo de sinusóides imaturos, somente no 7^a dia a apresentação lobular é retomada (PALMES, 2004).

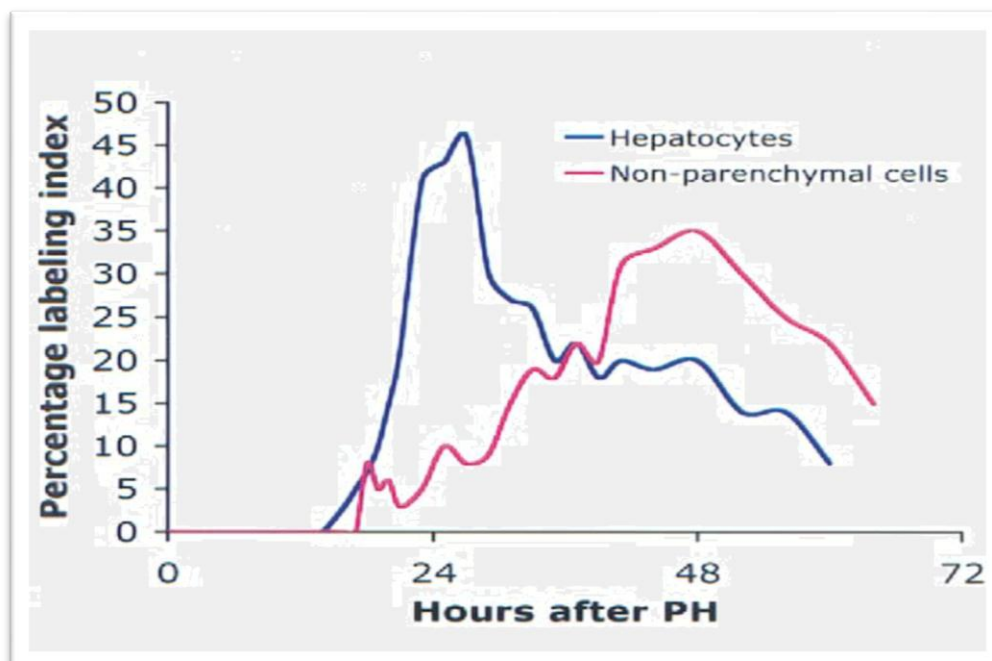


FIGURA 4: PROLIFERAÇÃO CELULAR X TEMPO (KONIARIS, 2003).

2.1.5 Mecanismos Moleculares

Em fígados normais somente 0,01% dos seus hepatócitos encontram-se em fase replicativa, ou seja, a grande maioria é quiescente ou na fase celular G₀. O estudo do mecanismo molecular da regeneração hepática já demonstrou três vias de sinalização: a) citocinas, responsáveis pela entrada do hepatócito no ciclo celular (transição G₀ para G₁), b) fatores crescimento, responsáveis pela progressão do ciclo celular (G₁ para S) e c) uma via ainda pouco conhecida que realiza a ligação metabólica entre a síntese de ribossomos e a replicação do DNA (FAUSTO, 2005)(FIGURA 5).

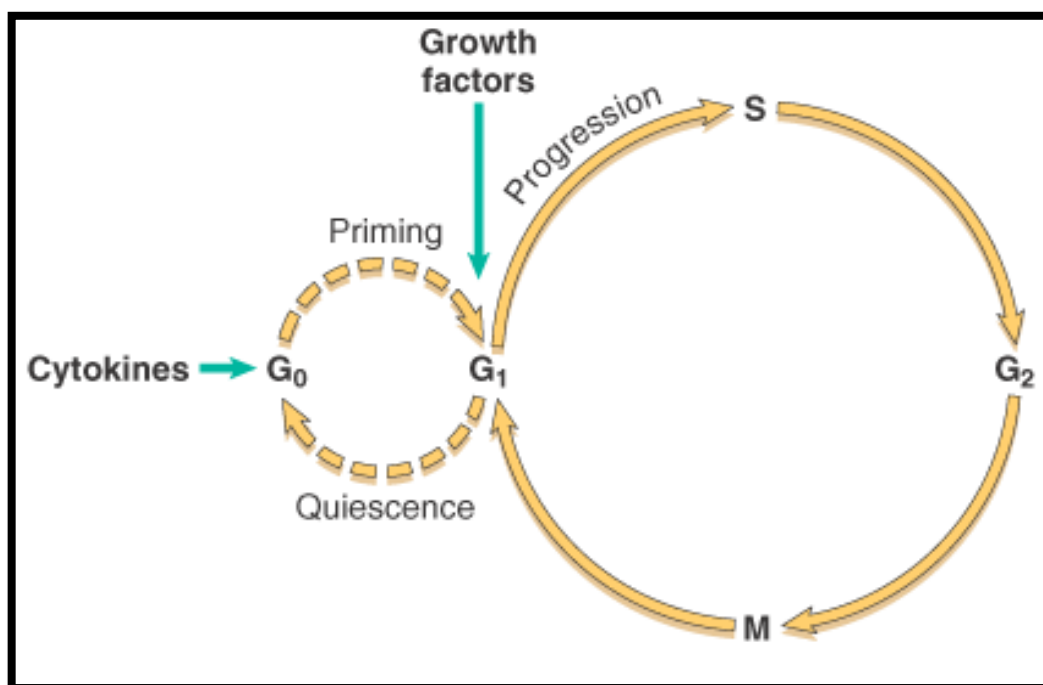


FIGURA 5: MECANISMOS MOLECULARES (FAUSTO, 2005)

A regeneração hepática é uma seqüência de eventos que envolvem múltiplas células além de uma complexa interação entre citocinas, fatores de crescimento e resposta metabólica (MOHAMMED, 2005). Após hepatectomia parcial os hepatócitos remanescentes e as células de Kupffer iniciam a produção de interleucina – 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral – α (TNF- α). A concentração destas citocinas atinge seu pico em 2 horas e dão início ao processo de iniciação do hepatócito através da ativação dos fatores de estímulo a síntese de DNA, entre eles: STAT3 (*signal transduction and activator of transcription* – 3), Nf κ pabb (*nuclear fato kappa B*) e AP-1 (*activating protein* – 1) (TAUB, 2004) (FIGURA 6).

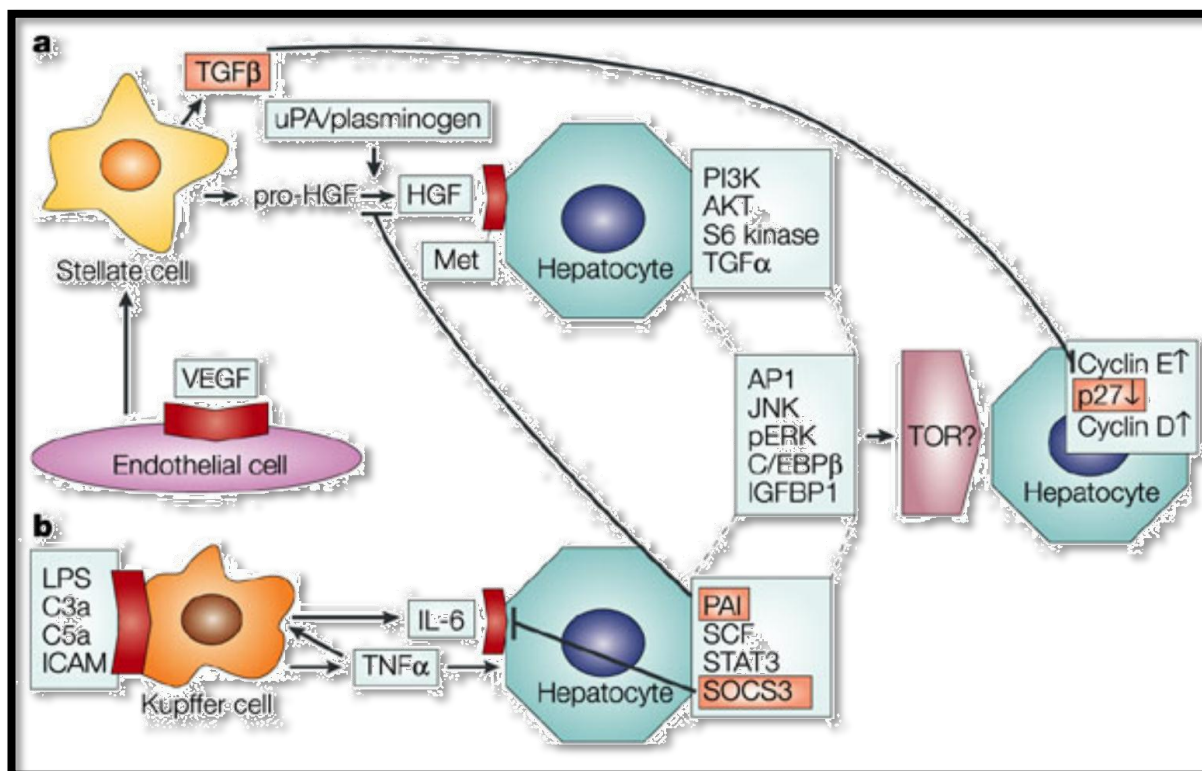


FIGURA 6: CITOCINAS – FATORES DE CRESCIMENTO (TAUB, 2004)

A participação das citocinas na iniciação dos hepatócitos é demonstrada através da falha na regeneração hepática de ratos que não expressam as moléculas do complemento C3a e C5a, e dessa forma, não conseguem produzir IL-6 e TNF- α (STREY, 2003). As citocinas após iniciarem o ciclo celular dos hepatócitos sensibilizam estes a responder aos fatores de crescimento que são responsáveis pela progressão do ciclo celular. A via de ativação conhecida como TNF \rightarrow TNFR \rightarrow NF κ B \rightarrow IL-6 \rightarrow STAT3 ativam genes com diversas funções, incluindo proliferação celular, proteínas de fase aguda e alças de retroalimentação negativa (SOCS3) (TAUB, 2004; FAUSTO, 2005)(FIGURA 7).

Após a iniciação dos hepatócitos pelas citocinas, a continuidade do processo e a proliferação celular dependem da ação dos fatores de crescimento, os mais estudados são: HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), TGF- α (*Transforming growth factor – α*) e o EGF (*Epidermal growth factor*) (FAUSTO, 2005).

O HGF é produzido pelas células não parenquimatosas e atua nos hepatócitos por mecanismos paracrinos e endócrinos, através dos receptores *c-met* que estimulam a síntese de DNA (ZARNEGAR, 1995).

O TGF- α e o EGF são membros da família dos fatores de crescimento epidérmico, ambos ativam através de seus receptores a fosforilação oxidativa que estimula a síntese de DNA (HASHIMOTO, 1998).

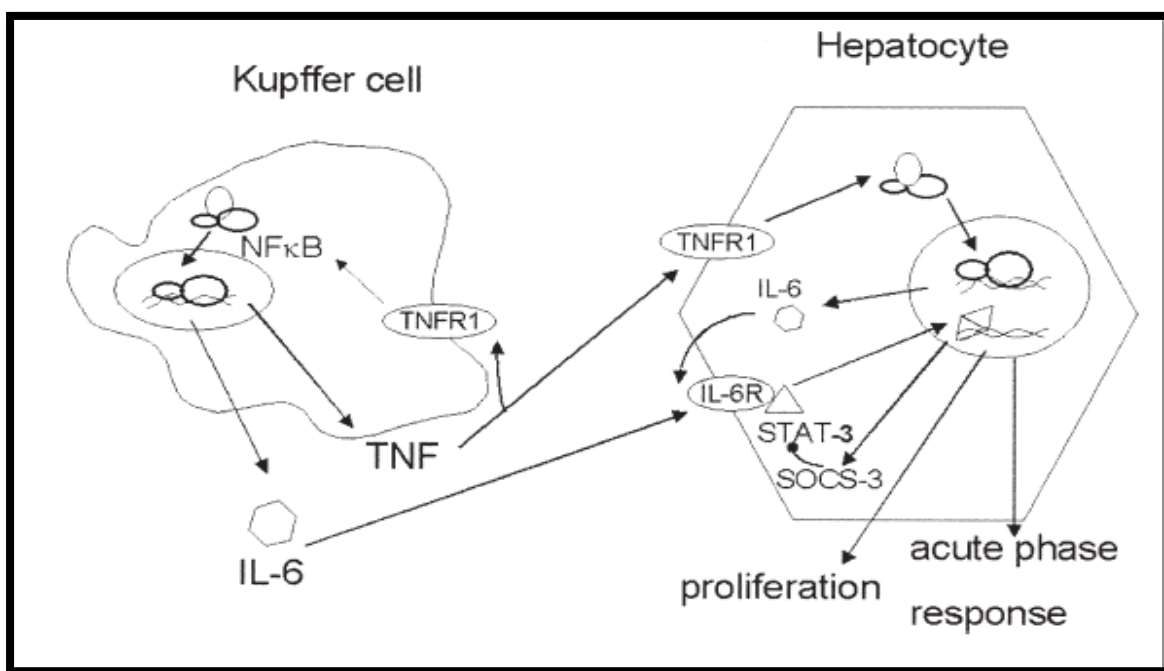


FIGURA 7: CITOCINAS (FAUSTO, 2005)

2.1.6 Mecanismos genéticos

A ativação dos proto-oncogenes (c-fos, c-myc, c-Kras, c-met e c-Erb) na fase de iniciação ou “priming” envolve a ação de mecanismos transcricionais (NFκB, STAT3 e AP-1) ocasionando a sensibilização dos hepatócitos à ação das citocinas além do estímulo à produção de receptores de fatores de crescimento (FAUSTO, 2002) (FIGURA 8). A transcrição do fator C/EBP β é conhecida como um dos fatores de inibição e finalização do processo regenerativo, afetando assim as vias de metabolismo e replicação (IAKOVA, 2003).

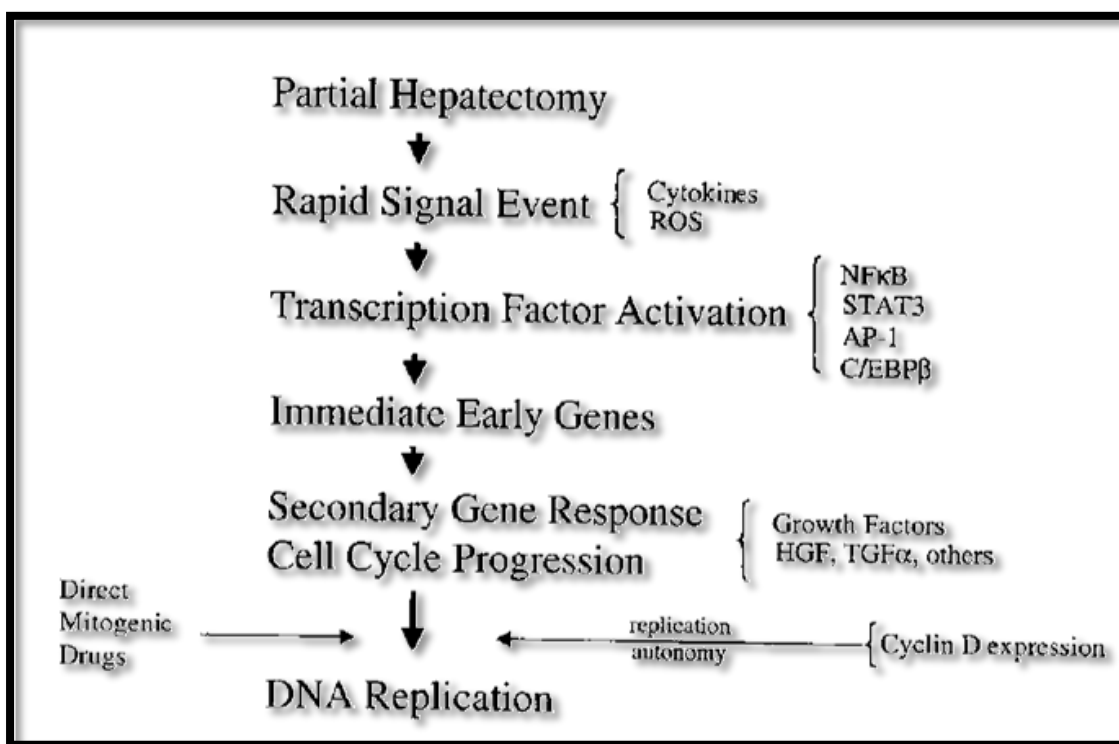


FIGURA 8: MECANISMOS GENÉTICOS (FAUSTO, 2002)

2.2 Fatores Clínicos relacionados com a regeneração hepática

Estudos em modelos animais e observações clínicas demonstram inúmeras variáveis clínicas capazes de afetar o processo regenerativo, sendo as principais: cirrose, idade, esteatose e resposta metabólica (DAS, 2001).

2.2.1 Cirrose

A cirrose é uma doença crônica que acomete difusamente o fígado sem envolver necessariamente todos os lóbulos hepáticos. Caracteriza-se, histologicamente, por regeneração nodular do parênquima, fibrose difusa e desorganização lobular e vascular do órgão (SCHIFF, 1999). A regeneração hepática nestas condições fica prejudicada devido ao bloqueio dos sinusóides hepáticos por colágenos oriundo das células estelares, o que impede a difusão de nutrientes e fatores de crescimento essenciais para o processo regenerativo, ocasionando ainda um bloqueio à hiperplasia compensatória dos hepatócitos (FRIEDMAN, 2001). Estudo realizado em 1990 demonstrou um aumento da mortalidade nos pacientes pós – hepatectomias quando apresentavam cirrose de 1% (fígados normais) para 8,7% (fígados cirróticos), ocasionado principalmente por falha no processo regenerativo funcional (BELGHITI, 2000).

2.2.2 Esteatose

O acúmulo de lipídeos no fígado ocasiona uma redução no espaço sinusoidal, com diminuição do fluxo hepático e dano mitocondrial por radicais livres de oxigênio (FARREL, 2002). Em ratos submetidos à hepatectomia parcial ocorreu uma falha no processo regenerativo devido um retardo no ciclo celular e aumento da fase G0 – G1, ocasionados por uma sinalização anormal do TNF- α e IL-6 (SELZNER, 2005).

2.2.3 Idade

A idade hepática representa um importante fator clínico na regeneração hepatocelular. Com o decorrer do tempo há uma diminuição da atividade enzimática, em especial da timidina – quinase, envolvida no processo de síntese de ADN (BIONDO-SIMÕES, 2006). A produção e secreção dos fatores hepatotróficos encontra-se reduzida em idosos, mas não sua resposta. Experimentalmente a reposição desses fatores após hepatectomia parcial em ratos idosos restaura a capacidade regenerativa hepática (KRUPCZAK-HOLLIS, 2004).

2.2.4 Resposta Metabólica

Após hepatectomia parcial em ratos há um aumento da oxidação de ácidos graxos e redução da oxidação da glicose no ciclo de Krebs, ocasionada por diminuição da atividade da acetil-coenzima A. A administração de glicose no período pós-operatório diminui a síntese de ADN por redução da expressão do gene *c – myc*, responsável pela progressão G1 – G2 (HOLECEK, 1999). Contudo a administração exógena de lipídios após hepatectomia parcial apresenta aumento do índice mitótico e da regeneração hepática, devido à utilização preferencial dos lipídios como substrato energético, síntese de fosfolípidos e colesterol (NAGAYAMA, 1989).

Há uma demanda aumentada por aminoácidos no tecido hepático em regeneração e a suplementação na dieta de aminoácidos de cadeia ramificada após hepatectomia parcial apresenta efeito estimulante na síntese de DNA (CHIBA, 1983). O estresse oxidativo, com formação de radicais livres de oxigênio, gerado pela agressão do parênquima hepático em modelos animais é reduzido pela suplementação de óleo de peixe e vitamina E. A ação antioxidante destas

substâncias estimula o processo regenerativo devido uma redução dos níveis de óxido nítrico e superóxido dismutase (KIRIMLIOGLU, 2006).

2.3 Processos regenerativos e Transplante Hepático

O transplante hepático representa a modalidade terapêutica ideal para os casos de disfunção hepática terminal, ocasionada por doenças agudas ou crônicas, proporcionando uma sobrevida média em cinco anos de 85% (STARLZ, 1989). A regeneração é crucial para o sucesso do transplante hepático. A lesão dos hepatócitos e sua perda neste cenário ocorrem por vários mecanismos, sendo os principais: lesão por isquemia, reação imunológica e lesão tóxica por drogas (DEBONERA, 2001; OLTHOFF, 2002).

2.3.1 Lesão Isquêmica

A injúria de preservação é ocasionada principalmente por mecanismo de isquemia do hepatócito, levando a instabilidade e destruição da membrana celular por inativação dos canais de cálcio (UPADHYA, 2003). É considerado um fenômeno vascular, semelhante à rejeição hiperaguda, com aumento da adesão de plaquetas ao endotélio, trombose intravascular e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (URATA, 1997). O fígado tolera a lesão isquêmica até certo “ponto de retorno”, após isso ocorre uma grande ativação de citocinas e fatores replicativos celulares que levam a perda homeostasia do hepatócito e quebra da capacidade regenerativa hepática (DEBONERA, 2001).

2.3.2 Massa Hepática

A massa hepática transplantada é uma importante variável prognóstica após transplante hepático, e os enxertos considerados “*small-for-size*” apresentam uma sobrevida reduzida (KAM, 1987). Em humanos a relação entre massa hepática / massa corpórea menor que 0,4 ocasiona uma redução da sobrevida do enxerto e hiperbilirrubinemia prolongada (LO, 1999). Em modelos animais de transplante hepático parcial com indução da lesão isquêmica há uma menor tolerância á isquemia e uma resposta regenerativa distinta, inversamente proporcional a duração da lesão, devido à maior produção de IL-6 e TNF- α (CLAVIEN, 2002).

2.3.3 Imunosupressores

O desenvolvimento da terapia imunossupressora apresentou importante impacto na sobrevida tanto do enxerto como do paciente, a introdução da Ciclosporina representou a mudança do transplante hepático de uma terapia experimental para uma verdadeira opção clínica (STARZL, 1981). Mesmo com a terapia imunossupressora cerca de 70% dos pacientes desenvolvem rejeição celular aguda, aproximadamente 5-10% destes evoluíram com rejeição crônica, tendo como célula dominante do mecanismo de rejeição os linfócitos T (GRANELLI-PIPERNO, 1990).

Após o início do funcionamento do enxerto hepático a resposta imune deve ser inibida para evitar a rejeição aguda do mesmo, contudo a inibição dessa resposta imunológica interfere no processo regenerativo dos hepatócitos necessário para recuperação funcional do enxerto (NAGY, 1998).

O glicocorticóide, rotineiramente usado em protocolos de imunossupressão, tem demonstrado inibição da progressão do ciclo celular e redução da regeneração após transplante hepático em modelos experimentais através da inibição dos receptores das citocinas e fatores de crescimento (TAMASI, 2001; DEBONERA, 2003).

Os inibidores da calcineurina, Ciclosporina A e Tacrolimus, promovem um aumento da regeneração hepática através de mecanismos imunológicos, por inibição da produção de IL-2 e da atividade das células *natural killer* (TANNURI, 2007). A ação antiproliferativa do Sirolimus inibe a replicação dos hepatócitos em regeneração, há uma redução da expressão dos receptores para os fatores de crescimento epidérmico (FRANCAVILLA, 1992).

2.3.3.1 Ação do Tacrolimus (FK560) na regeneração hepática

O Tacrolimus ou FK506 (Prograf®) é um antibiótico macrolídeo isolado a partir do fungo *Streptomyces tsukubaensis*, com ação imunossupressora cem vezes mais potente que a Ciclosporina. Atua por inibição da calcineurina e bloqueio de proteínas citoplasmáticas que impedem a formação e liberação de IL-2 (GOTO, 1987; WIEDERRECHT, 1993). O seu metabolismo é através do citocromo P450 com meia-vida de eliminação em torno de 12 horas. A via de administração é oral com doses entre 0.1 – 0.3 MG/Kg/dia fracionadas em duas etapas. Os principais efeitos adversos são nefrotoxicidade e neurotoxicidade (HOOKS, 1994).

O efeito positivo do Tacrolimus na regeneração hepática foi demonstrado pela primeira vez por Fancavilla *et al* (1989) num estudo experimental em ratos submetidos à hepatectomia á 40% e 70%. Neste estudo o grupo tratado com tacrolimus no pré-operatório apresentou um aumento de seis vezes no número de hepatócitos em mitose e 35 vezes na síntese de DNA comparados ao controle.

O estímulo a regeneração hepática pelo tacrolimus ocorre por mecanismos imunológicos e não imunológicos. Atua diretamente como fator de crescimento dos hepatócitos e proteção das células endoteliais em formação, além disso, inibe as células *Natural Killer* com redução da apoptose das células parenquimatosas (FRANCAVILLA, 1990a,1991a).

A inibição da apoptose dos hepatócitos está associada ao aumento da expressão dos receptores do fator de crescimento HGF e pela inibição da atividade das células *natural killer* (TAMURA, 1998). O tacrolimus ainda diminui de forma geral a resposta inflamatória após hepatectomia devido ao bloqueio dos antígenos classe II, interleucina 1 e interleucina 2 causando um menor dano aos hepatócitos em proliferação (SATO, 1992; OKAMURA, 1992).

Em modelos animais o pré-tratamento com tacrolimus demonstra ser um fator protetor contra a lesão isquêmica adicional (GARCIA-CRIADO, 1997; BEN, 2000), devido a uma melhora na microcirculação (KAWANO, 1995; SASAKI, 2004; NAKACHE, 2007), redução da produção de radicais livres de oxigênio (KAWANO, 1996; HAN, 2006) e proteção mitocondrial devido menor resposta inflamatória (SAKR, 1993; KAIBORI, 2001).

O fígado em regeneração apresenta uma farmacocinética distinta de acordo com as drogas imunossupressoras, há uma inibição do citocromo P450 o que ocasiona uma maior biodisponibilidade do Tacrolimus. Porém não ocorre efeito citotóxico direto pela droga (LODEWIJK, 2009).

O estímulo regenerativo ocasionado pelo tacrolimus é mais potente em termos molares que a Ciclosporina, o que diminui a possibilidade dos efeitos colaterais da droga, e já demonstrou ter ação hepatotrófica direta agindo como fator de crescimento hepatocitário (MAZZAFERRO, 1990; FRANCAVILLA, 1991).

O mecanismo imunológico de estímulo da regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia á 70% ocorre através da inibição dos antígenos classe II (SATO, 1992) que ocasiona uma menor produção de IL-2 (OKAMURA, 1992;

TANAKA, 1993) com menos ativação das células *natural killer* que apresentam efeito citotóxico sob os hepatócitos em regeneração (TANIGAWA, 2000).

A inibição da produção de IL-2 e das células natural killer pelo Tacrolimus promovem uma maior tolerância a lesão isquêmica pelos hepatócitos em regeneração, pois há uma menor produção e liberação de radicais livres de oxigênio pelas células de Kupffer, agindo assim como agente protetor endotelial (TOJIMBARA, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA

O projeto de pesquisa do presente estudo foi realizado de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e Lei Federal 6638, submetido, analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (CEP/SD), em 26 de setembro de 2007, sob o registro CEP/SD: AN.008.004.07.08 (ANEXO 1).

3.2 ANIMAIS

Neste estudo experimental foram utilizados 40 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) adultos, machos, provenientes do biotério de criação do Instituto Politécnico da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O peso médio inicial dos animais foi 510,08 g (DP \pm 11.66), variando de 424 g a 559,8 g.

3.3 AMBIENTE E ALIMENTAÇÃO

O experimento foi realizado no Centro de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR, o qual conta com ambiente apropriado para manipulação dos animais e execução dos procedimentos cirúrgicos. Durante todo o período de estudo os animais permaneceram em ambiente com controle de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ruído e luminosidade (ciclos claro-escuro de 12 horas – *Cronomat*[®], Mallory do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). As condições de higiene foram mantidas com troca diária das forrações de cepilho que acumulavam dejetos. Esses animais foram agrupados em número de cinco, em gaiolas coletivas de aproximadamente 0,022 m³ (41,4 cm x 34,4 cm x 16 cm). As gaiolas, em número total de 10, foram identificadas e acomodadas sobre estantes horizontais. Durante todo o período de aclimação, que foi de 14 dias, e de estudo, os animais receberam água e ração balanceada *ad libitum*, padrão *Nuvilab CR1*[®], produzido pela empresa Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil (ANEXO 2).

3.4 GRUPOS

Após o período de aclimação, os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em 2 grupos de 20 ratos. Cada um desses grupos foi subdividido em 2 subgrupos conforme a medicação utilizada e o dia da morte:

- **Grupo de estudo (E):** constituído por 20 animais que receberam Tacrolimus desde o terceiro dia de pré-operatório até a morte, subdividindo-se em:
 - a-) E.24h:** constituído por 10 animais que receberam Tacrolimus desde o terceiro dia de pré-operatório até a morte em 24 horas após a hepatectomia;
 - b-) E.7d:** constituído por 10 animais que receberam Tacrolimus desde o terceiro dia de pré-operatório até a morte em 7 dias após a hepatectomia;
- **Grupo controle (C):** constituído por 20 animais que receberam solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% desde o terceiro dia de pré-operatório até a morte, subdividindo-se em:
 - a-) C.24h:** constituído por 10 animais que receberam solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% desde o terceiro dia de pré-operatório até a morte em 24 horas após a hepatectomia;
 - b-) C.7d:** constituído por 10 animais que receberam solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% desde o terceiro dia de pré-operatório até a morte em 7 dias após a hepatectomia;

3.5 PESAGEM DOS ANIMAIS

A pesagem diária dos animais foi feita em balança modelo *AM 500 Marte*[®], regulada nos padrões do Inmetro. Foram anotados os pesos de cada animal desde o terceiro dia de pós-operatório até a data da morte e registrados em planilha do programa *Microsoft Office Excel*[®] (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA). O peso diário foi usado para calcular a dose da medicação em estudo (0,1mg/Kg/dia). O peso final permitiu avaliar diferenças na perda de peso entre os grupos.

3.6 ADMINISTRAÇÃO DE TACROLIMUS E SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA

Os animais foram apreendidos pela cauda, a fim de evitar trauma. Em seguida foram submetidos à anestesia inalatória com vaporizador de isoflurano

(*Isoforine*[®] - laboratório Cristália) na concentração de 1,5 a 3% e fluxo de oxigênio variando de 0,5 a 3L/min. Individualmente, cada rato foi colocado em campânula fechada através da qual o plano anestésico foi monitorado pelos movimentos voluntários e respiratórios do animal, sendo o mesmo retirado da campânula assim que apresentasse parada dos movimentos voluntários, preservando ainda os movimentos ventilatórios para o procedimento de pesagem diária e gavagem. Os ratos ainda anestesiados foram contidos com a mão esquerda do pesquisador, através da região dorsal do animal. Imobilização adequada e atraumática foi conseguida apoiando-se o segundo e terceiro dedos do pesquisador entre a cabeça e os membros anteriores do rato, e o primeiro e quarto dedos entre os membros posteriores e tronco anterior.

Cápsulas de Tacrolimus 1 mg (JANSSEN-CILAG, São Paulo, SP, Brasil) foram diluídos em solução aquosa até a dosagem de 1mg/ml. Dose padronizada de 0,1 mg/kg/dia foi fornecida via sondagem orogástrica rígida aos animais dos grupos E.24h e E.7d. Nos grupos controle, utilizou-se solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% (Baxter, São Paulo, SP, Brasil).

Conforme técnica descrita, o rato foi contido com a mão esquerda do pesquisador, enquanto na mão direita a sonda plástica rígida acoplada a uma seringa de 1 ml contendo a dose apropriada da solução foi introduzida até o ponto correspondente à distância entre a boca e o apêndice xifóide do animal (Figura 10A e 10B). Após lenta infusão da solução e retirada da sonda, a fim de diminuir o risco de regurgitação, o rato foi mantido com a porção cefálica mais elevada que a caudal até recuperar-se da anestesia.

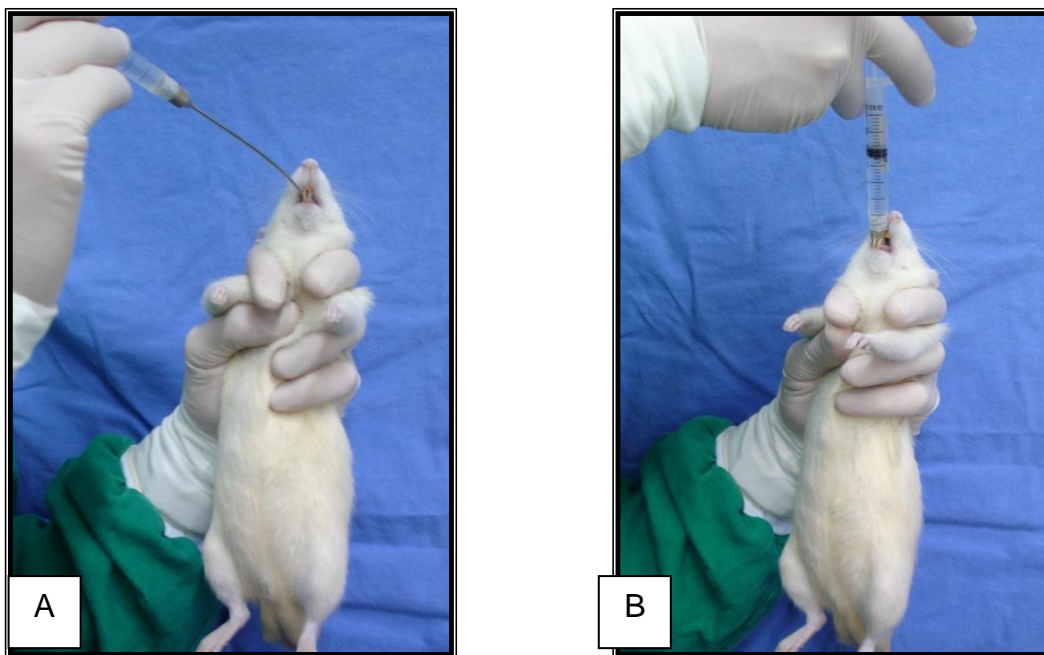


FIGURA 9 – ADMINISTRAÇÃO DA DROGA: (A) APREENSÃO DO RATO SEDADO E REALIZAÇÃO DE SONDAGEM OROGÁSTRICA COM CÂNULA PLÁSTICA RÍGIDA; (B) ADMINISTRAÇÃO DO VOLUME DE MEDICAÇÃO PREVIAMENTE ASPIRADO NA SERINGA

3.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais permaneceram em jejum 12 horas antes do procedimento cirúrgico. Após ser anestesiado, cada animal foi submetido à tricotomia da região ventral com barbeador elétrico (Figura 11), colocado em mesa cirúrgica apropriada, fixados os 4 membros, realizada a antisepsia com solução tópica de polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) e coberto com campos estéreis.



FIGURA 10 – TRICOTOMIA DA REGIÃO VENTRAL COM APARELHO DE TOSA, SOB EFEITO DE ANESTESIA

A equipe foi composta de um único cirurgião (o pesquisador), um auxiliar responsável pelo monitoramento do plano anestésico do animal e o orientador da pesquisa. O procedimento cirúrgico consistiu em realizar a laparotomia mediana de 4cm com tesoura de Metzembaun a partir do apêndice xifóide, abertura por planos, liberação dos ligamentos hepáticos e a ressecção dos segmentos lateral esquerdo e mediano do fígado correspondendo à 70% da massa hepática total com ligadura de monocril 3-0 (Figura 12A a 12F).

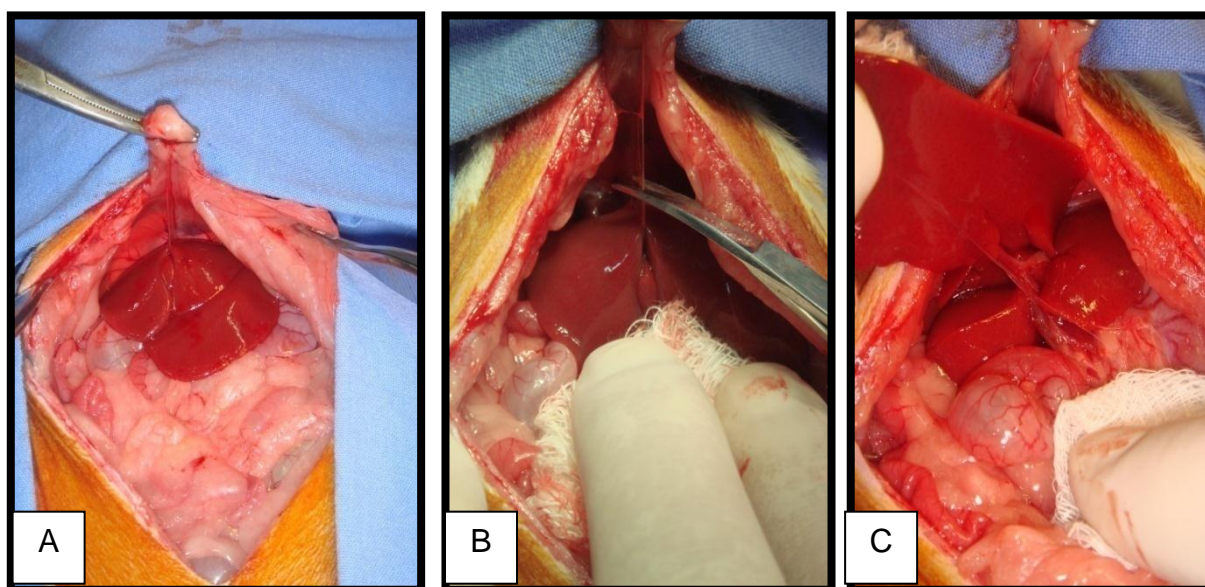


FIGURA 11 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: (A) VISÃO DO FÍGADO; (B) LIBERAÇÃO DOS LIGAMENTOS CIRCUNDANTES DO FÍGADO; (C) IDENTIFICAÇÃO DOS LOBOS A SEREM RESSECADOS.

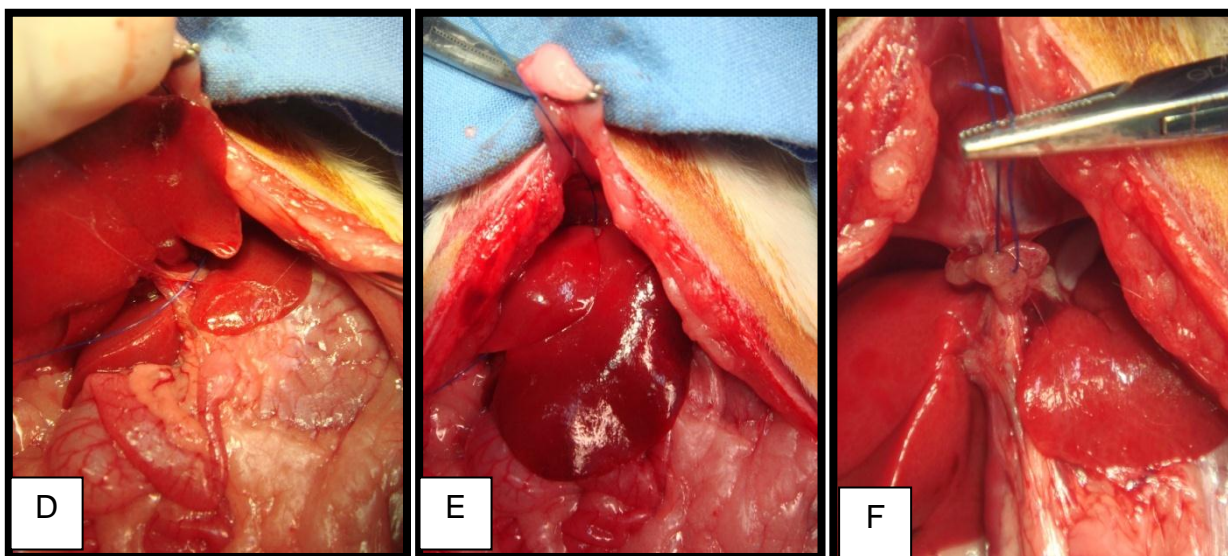


FIGURA 12 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: (D) LIGADURA DOS LOBOS LATERAL ESQUERDO E MEDIANO; (E) VISÃO FRONTAL DA LIGADURA; (F) ASPECTO FINAL APÓS A RESSECÇÃO DE 70% DA MASSA HEPÁTICA

O fechamento da laparotomia foi realizado com sutura contínua de prolene 3-0. O espécime ressecado foi pesado para posterior cálculo da regeneração hepática pela fórmula de Kwon e em seguida desprezado.

A documentação fotográfica foi realizada com câmera digital Sony® modelo Cyber-shot DSC-T10 (Sony, Tokyo, Japão), com resolução de 7.2 megapixels.

3.8 MORTE

No 1º de dia pós-operatório, 10 animais do grupo E.24h e 10 do grupo C.24h foram submetidos à morte por dose letal de éter etílico inalatório em câmpnula de vidro (Figura 13A). Logo em seguida o rato foi pesado, colocado em decúbito dorsal, realizada antissepsia, colocação de campos estéreis e aberta a incisão prévia (Figura 13B).

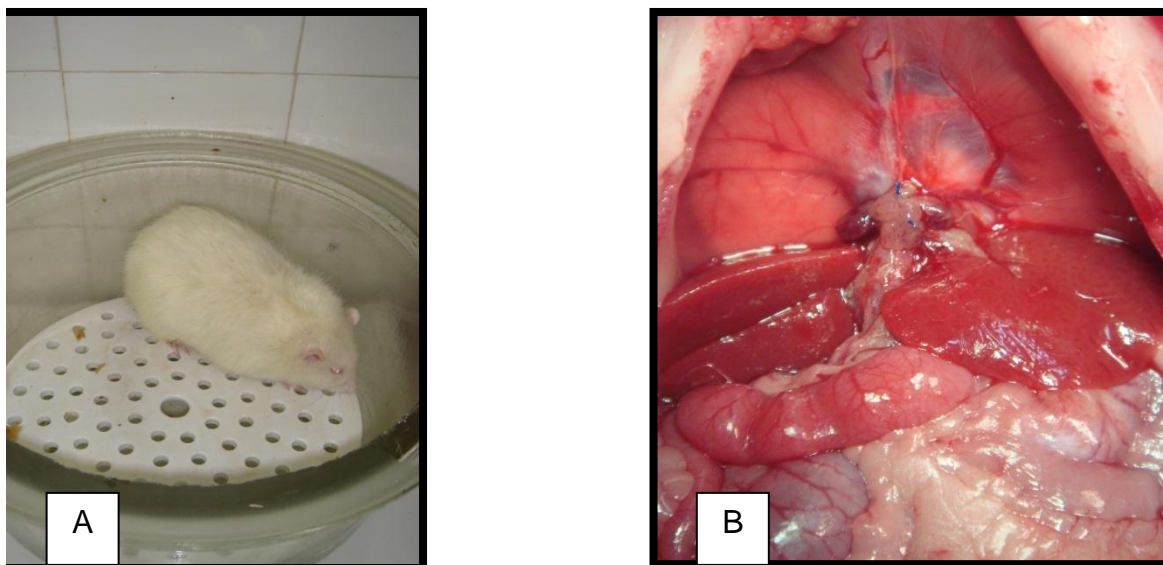


FIGURA 13 – RESSECÇÃO DO FÍGADO REGENERADO NO 1º OU 7º DIA APÓS HEPATECTOMIA À 70%: (A) MORTE POR DOSE LETAL DE ÉTER EM CAMPÂNULA DE VIDRO; (B) ABERTURA DA LAPAROTOMIA PRÉVIA

Após a retirada cuidadosa dos pontos da laparotomia mediana, realizou-se inspeção da cavidade para lise de bridas e documentação fotográfica do fígado regenerado. Realizou-se a liberação de todo o fígado e secção das veias supra-hepáticas, porta e cava inferior (Figura 14A a 14C). O fígado retirado foi pesado e para estudo histológico foi ressecada uma porção do segmento superior do lobo direito. Os espécimes ressecados no momento da morte foram armazenados em solução de formalina 10% (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil) após cálculo da porcentagem de regeneração hepática pela fórmula de Kwon.

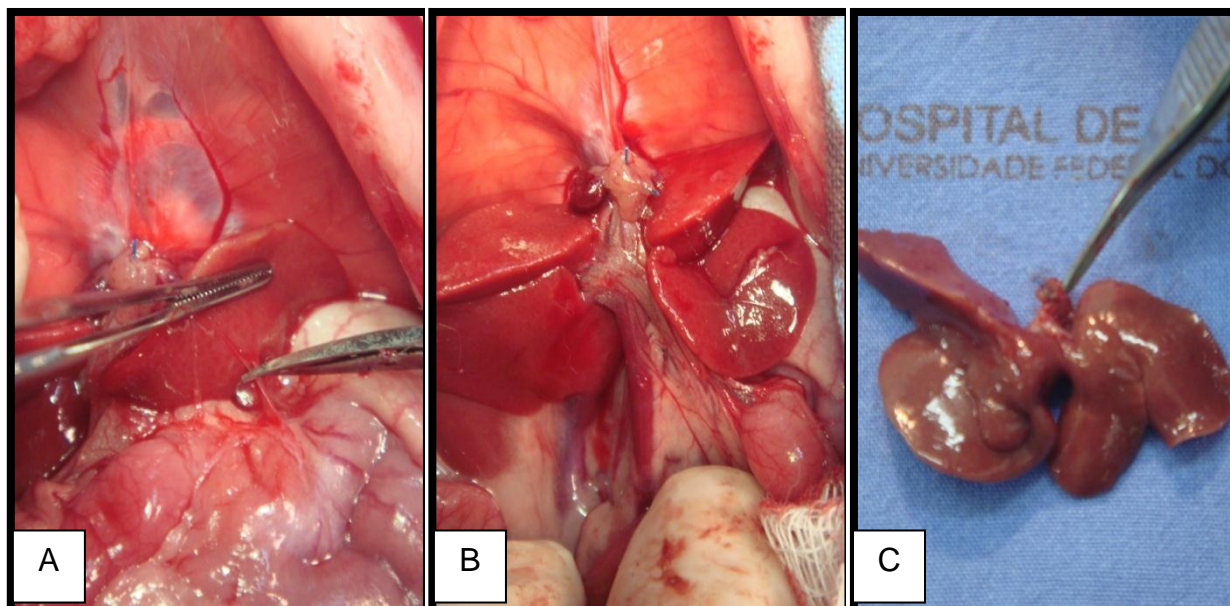


FIGURA 14 – RESSECÇÃO DO FÍGADO REGENERADO NO 1º OU 7º DIA APÓS HEPATECTOMIA À 70%: (A) LIBERAÇÃO DAS ADERÊNCIAS; (B) IDENTIFICAÇÃO DOS LOBOS REMANESCENTES COM SECÇÃO DE SUA VASCULARIZAÇÃO; (C) PEÇA HEPÁTICA REGENERADA RESSECADA

O estudo anátomo-patológico das peças foi realizado através da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) para cálculo do índice mitótico e análise imunoistoquímica com Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) e Ki-67.

3.9 ANÁLISE DO PESO CORPORAL

Foram analisados os dados referentes aos pesos corporais iniciais, ou seja, no dia da hepatectomia e na data da morte. Esses dados foram comparados entre os grupos de estudo (E.24h X E.7d) e também entre os grupos controle (C.24h X C.7d) com médias e desvio padrão.

3.10 ANÁLISE DO PESO DO FÍGADO RESSECADO E REGENERADO

Foram analisados os dados referentes aos pesos dos espécimes ressecados na hepatectomia, aos pesos estimados do fígado remanescente na data da hepatectomia e ao peso total estimado do fígado na data da ressecção. Foram também avaliados os pesos do fígado no momento da morte e a relação do peso hepático estimado no dia da hepatectomia e da morte com o peso corporal do

animal no respectivo momento. Esses dados foram comparados entre os grupos de estudo (E.24h X E.7d) e também entre os grupos controle (C.24h X C.7d) com médias e desvio padrão.

3.11 CÁLCULO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON

Logo após a morte dos animais, calculou-se a regeneração hepática de cada grupo pela fórmula de Kwon (KWON, 1990). Esta fórmula fornece a taxa de regeneração baseada no peso:

$$\% = D/E \times 100$$

Onde $E = R/0,7$;

D = peso do fígado por 100 gramas de peso do animal no dia da morte;

E = representa o peso estimado por 100 gramas de peso do animal antes da hepatectomia, a qual é calculada pelo peso do fígado ressecado (R).

3.12 DETERMINAÇÃO DA REGENERAÇÃO PELO ÍNDICE MITÓTICO (HE)

Para avaliação da regeneração hepática utilizando-se o índice mitótico, um fragmento da porção superior do lobo direito após a morte de cada animal foi colocado em frasco contendo formalina 10% e enviado ao Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR. As amostragens macroscópicas foram padronizadas para todos os espécimes, realizando-se cortes transversais na porção média do fragmento hepático. Após desidratação, diafanização e emblocamento dos tecidos em parafina, foram realizadas microtomias de 4 μ m e coloração com Hematoxilina-Eosina.

Analísaram-se os cortes histológicos com microscópio óptico *Olympus*[®] (Olympus, Tóquio, Japão). As imagens foram captadas por câmera fotográfica *Sony*[®] CCD *Íris* (Sony, Tóquio, Japão), transmitidas a monitor colorido *Triniton Sony*[®], congeladas e digitalizadas por meio de placas de *Oculus TCX*[®]. Analísaram-se 10 campos de grande aumento (400X) de maneira aleatória, sendo as figuras de mitose registradas e fotografadas (Figura 15A e 15B).

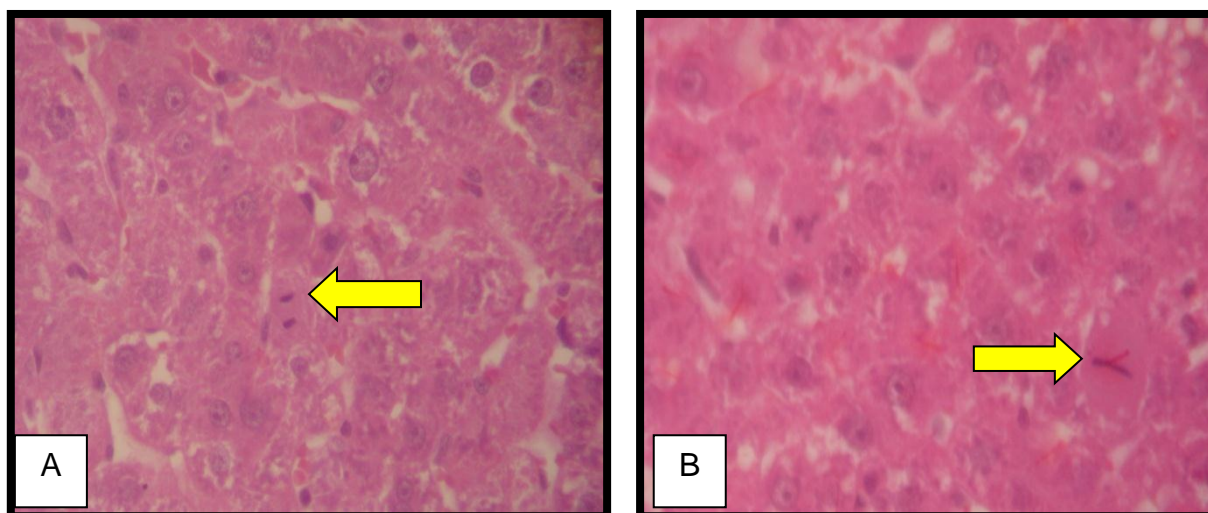


FIGURA 15 – (A e B) FOTOMICROGRAFIA REVELANDO FIGURAS DE MITOSE (SETAS) (HE, X400)

3.13 COLORAÇÃO PELA IMUNOHISTOQUÍMICA COM PCNA

O estudo imunoistoquímico foi desenvolvido no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR. Foram utilizadas lâminas silanizadas para evitar o descolamento dos cortes histológicos durante a coloração. As peças foram desparafinizadas e reidratadas em concentrações adequadas de etanol e água destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com a utilização de água oxigenada (H_2O_2) a 3% por 5 minutos, seguido por uma breve rinsagem em água destilada e lavagem de 15 minutos em PBS. As peças foram então colocadas em um tampão de citrato com pH de 6,0 e então aquecidas em forno de microondas a 98° C por 5 minutos para o PCNA. Após, as peças foram resfriadas à temperatura ambiente por 20 minutos e rinsadas em PBS. Anticorpos primários anti-PCNA (Monoclonal, Código M0879, Dako, Carpinteria, USA) foram aplicados “*overnight*” à temperatura de 2° C a 8° C. Após banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação de anticorpo biotinilado por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após novo banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação do complexo estreptavidina – peroxidase por 30 minutos, ainda à temperatura ambiente. Foi então realizado mais um banho em tampão fosfato e revelação da reação imune com Diaminobenzidina, seguido de contra-coloração com Hematoxilina. Na seqüência, os cortes foram desidratados e montados com bálsamo e lamínulas de vidro.

Analisaram-se os cortes histológicos com microscópio óptico *Olympus*[®] (Olympus, Tóquio, Japão). As imagens foram captadas por câmera fotográfica *Sony*[®] CCD *Íris* (Sony, Tóquio, Japão), transmitidas a monitor colorido *Triniton Sony*[®], congeladas e digitalizadas por meio de placas de *Oculus TCX*[®]. A positividade da coloração imunoistoquímica foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada. Controles positivos e negativos foram utilizados. As lâminas foram avaliadas sem a identificação dos grupos dos animais. Foram analisados 100 hepatócitos de maneira aleatória e considerados positivos os que coraram-se moderada ou fortemente e, deste modo, efetuada a porcentagem de células positivas (Figura 16A e 16B).

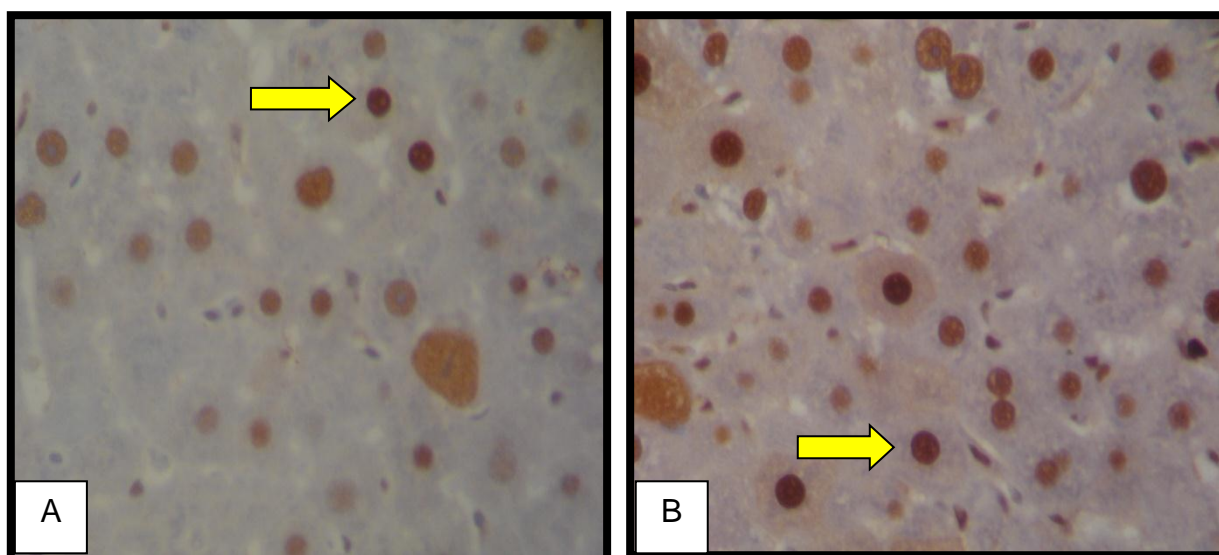


FIGURA 16 – (A e B) FOTOMICROGRAFIA REVELANDO POSITIVIDADE NUCLEAR PARA PCNA (SETAS) (IMUNOISTOQUÍMICA, X400)

3.14 COLORAÇÃO PELA IMUNOISTOQUÍMICA COM KI-67

O estudo imunoistoquímico foi desenvolvido no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR. Foram utilizadas lâminas silanizadas para evitar o descolamento dos cortes histológicos durante a coloração. As peças foram desparafinizadas e reidratadas em concentrações adequadas de etanol e água destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com a utilização de água oxigenada (H_2O_2) a 3% por 5 minutos, seguido por uma breve rinsagem em água destilada e lavagem de 15 minutos em PBS. As peças foram então colocadas em um tampão de citrato com pH de 6,0 e então aquecidas em forno de microondas a 98^o C por 30 minutos para o Ki-67. Após, as peças foram resfriadas à temperatura

ambiente por 20 minutos e rinsadas em PBS. Anticorpos primários anti-Ki67 (Monoclonal, Código NCL-Ki-67-MM1, Clone MM1, Novocastra, USA) foram aplicados “*overnight*” à temperatura de 2° C à 8° C. Após banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação de anticorpo biotinilado por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após novo banho em tampão fosfato, seguiu-se à aplicação do complexo estreptavidina – peroxidase por 30 minutos, ainda à temperatura ambiente. Foi então realizado mais um banho em tampão fosfato e revelação da reação imune com Diaminobenzidina, seguido de contra-coloração com Hematoxilina. Na seqüência , os cortes foram desidratados e montados com bálsamo e lamínulas de vidro.

Analísaram-se os cortes histológicos com microscópio óptico *Olympus*® (Olympus, Tóquio, Japão). As imagens foram captadas por câmera fotográfica *Sony*® CCD *Íris* (Sony, Tóquio, Japão), transmitidas a monitor colorido *Triniton Sony*®, congeladas e digitalizadas por meio de placas de *Oculus TCX*®.

A positividade da coloração imunoistoquímica foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada. Controles positivos e negativos foram utilizados. As lâminas foram avaliadas sem a identificação dos grupos dos animais. Foram analisados 100 hepatócitos de maneira aleatória e considerados positivos os que coraram-se moderada ou fortemente e, deste modo, efetuada a porcentagem de células positivas (Figura 17A e 17B).

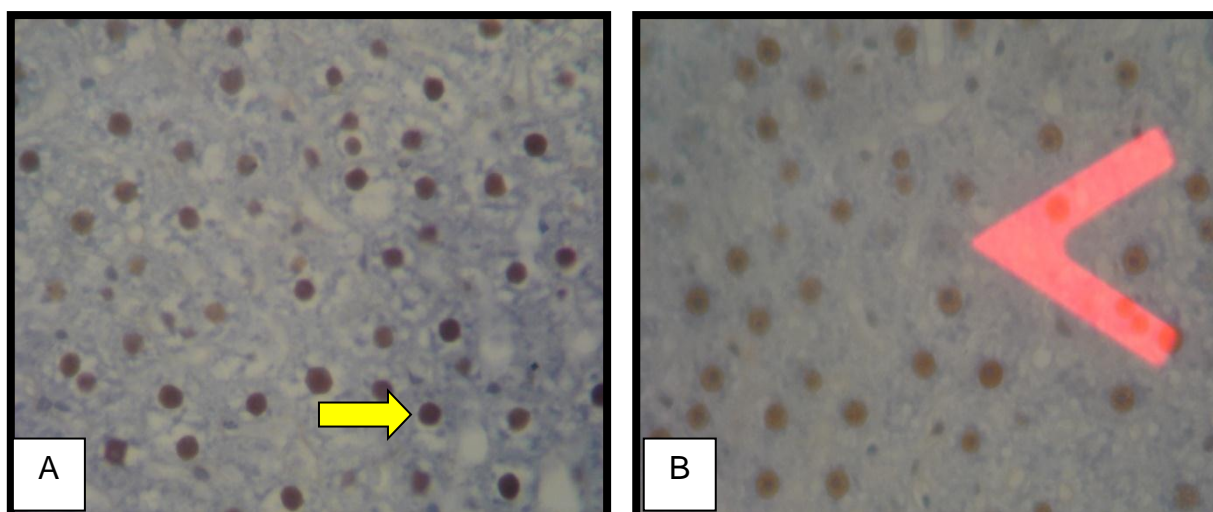


FIGURA 17 – FOTOMICROGRAFIA REVELANDO POSITIVIDADE NUCLEAR PARA Ki-67 (A) E NEGATIVIDADE PARA Ki-67 (B) (SETAS) (IMUNOISTOQUÍMICA, X400)

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram tabulados em planilha do programa *Microsoft Office Excel*® (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) (APÊNDICES 1-6), obtendo-se os valores médios (M), mediana, desvio padrão (DP) para cada variável nos diferentes tempos estudados.

Procedeu-se ao tratamento estatístico julgado adequado conforme a natureza dos dados analisados nos grupos controle e estudo, nos períodos 24 horas e 7 dias para as variáveis: pesos corporais (g) inicial; nos dias da hepatectomia e da morte; variação dos pesos corporais (g) inicial e no dia da morte; pesos do fígado (g) estimado restante, ressecado e total estimado, no dia da hepatectomia; peso do fígado (g) no dia da morte; relação do peso total estimado do fígado (g) no dia da hepatectomia e do peso do animal (g) no mesmo momento; relação do peso total do fígado (g) no dia da morte e do peso do animal (g) no mesmo momento; porcentagem de regeneração do fígado pela fórmula de Kwon; porcentagem do Ki67; porcentagem do PCNA; porcentagem do índice mitótico. Observou-se o pré-requisito da distribuição normal (Gaussiana) das variáveis para a escolha do teste estatístico. Na análise não-paramétrica foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* para as comparações: pesos corporais (g) inicial e no dia da morte no grupo controle no período 7 dias; variação dos pesos corporais inicial e no dia da morte (g) dentro dos grupos; peso corporal (g) no dia da morte entre os grupos no período 24 horas; relação do peso total estimado do fígado (g) no dia da hepatectomia e do peso do animal (g) no mesmo momento entre os grupos nos períodos 24 horas e 7 dias; relação do peso total do fígado (g) no dia da morte e do peso do animal (g) no mesmo momento no período 24 horas; porcentagem do Ki67 dentro do grupo estudo e entre os grupos no período 7 dias; porcentagem do índice mitótico entre os grupos no período 24 horas. Nos demais resultados utilizou-se a análise paramétrica com o teste “*t*” de *Student*. Para todos os testes estatísticos o nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 PESOS DOS ANIMAIS

Ocorreu perda ponderal nos grupos e subgrupos comparando-se o peso inicial com o peso no dia da morte dos animais, sendo estatisticamente significativa em ambos os grupos. (GRÁFICO 1).

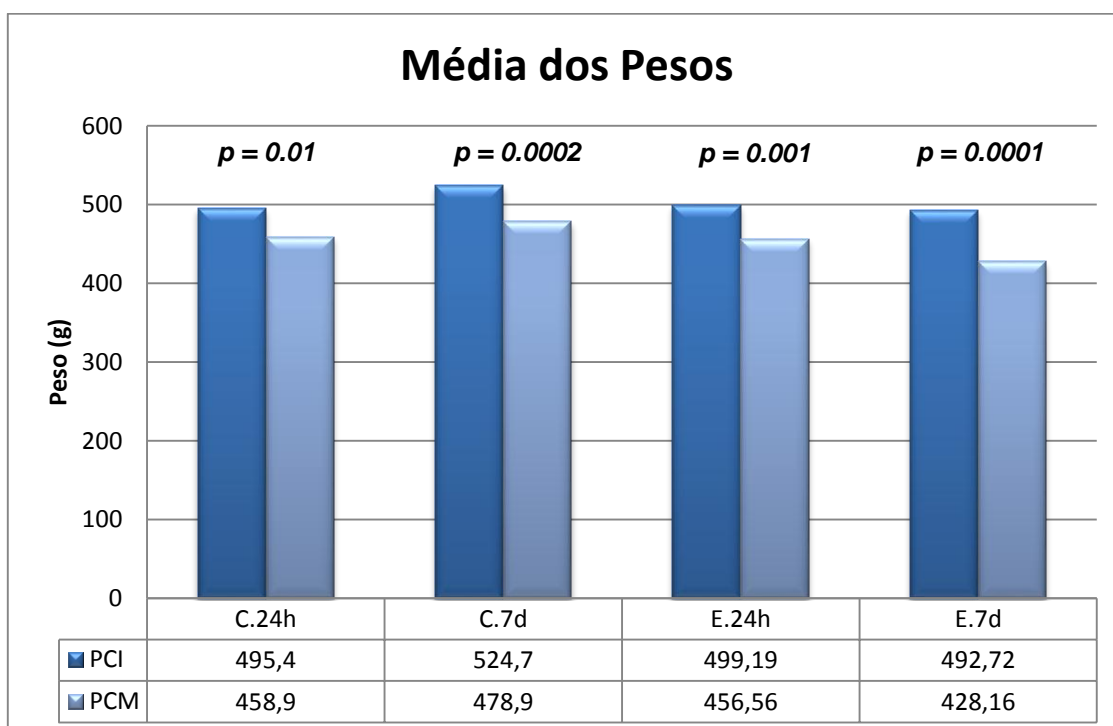


GRÁFICO 1 – MÉDIA DOS PESOS INICIAL E NA MORTE EM CADA GRUPO \pm DESVIO PADRÃO. C.24h: GRUPO CONTROLE 24 HORAS; C.7d: GRUPO CONTROLE 7 DIAS; E.24h: GRUPO ESTUDO 24 HORAS; E.7d: GRUPO ESTUDO 7 DIAS; PCI: PESO CORPORAL INICIAL; PCM: PESO CORPORAL NA MORTE. COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE OS GRUPOS (p)

Porém quando comparadas as médias das variações dos pesos corporal inicial e no dia da morte dentro do grupo controle (24 horas e 7 dias) e do grupo de estudo (24 horas e 7 dias), houve significância estatística apenas nos grupo de estudo ($p=0,03$) (TABELA 1).

TABELA 1– ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA VARIAÇÃO DOS PESOS CORPORAIS INICIAL E NO DIA DA MORTE DENTRO DOS SUBGRUPOS CONTROLE 24 HORAS E 7 DIAS E SUBGRUPOS ESTUDO 24 HORAS E 7 DIAS

GRUPOS	VARIAÇÃO DOS PESOS CORPORAIS INICIAL E NO DIA DA MORTE (g)			P
	média	±	dp	
Controle 24 horas	32,69	±	3,55	0,35
Controle 7 dias	24,98	±	1,65	
Estudo 24 horas	27,20	±	2,74	0,03
Estudo 7 dias	43,01	±	0,35	

Nota: dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística

Na comparação intergrupos dos pesos dos animais no início e no dia da morte, houve variação estatisticamente significativa entre os subgrupos de 7 dias controle e estudo no momento inicial e da morte. (TABELA 2).

TABELA 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA INTERGRUPOS (CONTROLE X ESTUDO) DAS MÉDIAS DO PESO CORPORAL INICIAL E NO DIA DA MORTE NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS

GRUPOS	INICIAL (g)			p	MORTE (g)			p
	média	dp	±		média	dp	±	
Controle 24 horas	495,4	±	36,8	0,39	458,94	±	30,6	0,40
Estudo 24 horas	499,19	±	24,39		456,56	±	29,87	
Controle 7 dias	524,7	±	23,0	0,03	483,4	±	25,9	0,002
Estudo 7 dias	492,72	±	43,18		428,16	±	42,60	

Nota: dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística

4.2 PESOS DO FÍGADO

No momento da hepatectomia 70%, comparando-se o peso estimado do fígado restante, do fígado ressecado e do peso total hepático entre os grupos controle e de estudo, somente o grupo 24 horas apresentou diferença estatisticamente significativa (TABELA 3).

TABELA 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DO PESO ESTIMADO DO FÍGADO RESSECADO, PESO ESTIMADO DO FÍGADO RESTANTE E DO PESO TOTAL ESTIMADO DO FÍGADO NO DIA DA HEPATECTOMIA ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ESTUDO NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS

GRUPOS	RESSECADO (g)			REST. ESTIMADO (g)			TOTAL ESTIMADO (g)		
	média	dp	p	média	dp	p	média	dp	p
Controle 24 horas	8,7	± 0,9	0,05	3,7	± 0,4	0,02	12,4	± 1,3	0,05
Estudo 24 horas	8,1	± 0,48		3,43	± 0,21		11,65	± 0,68	
Controle 7 dias	8,9	± 1,0	0,27	3,8	± 0,4	0,28	12,7	± 1,5	0,27
Estudo 7 dias	9,18	± 0,97		3,93	± 0,41		13,11	± 1,39	

Nota: dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística

4.3 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON

A regeneração hepática avaliada pela fórmula de Kwon mostrou crescimento estatisticamente significativo do remanescente hepático nos dois grupos (estudo/controle), nas primeiras 24 horas e no sétimo dia pós-hepatectomia.(GRÁFICO 3). Quando pareados os resultados intergrupos, os animais que receberam Tacrolimus mostraram o maior índice de regeneração hepática, atingindo significância estatística quando comparado ao subgrupo de animais mantidos com placebo (GRÁFICO 4).

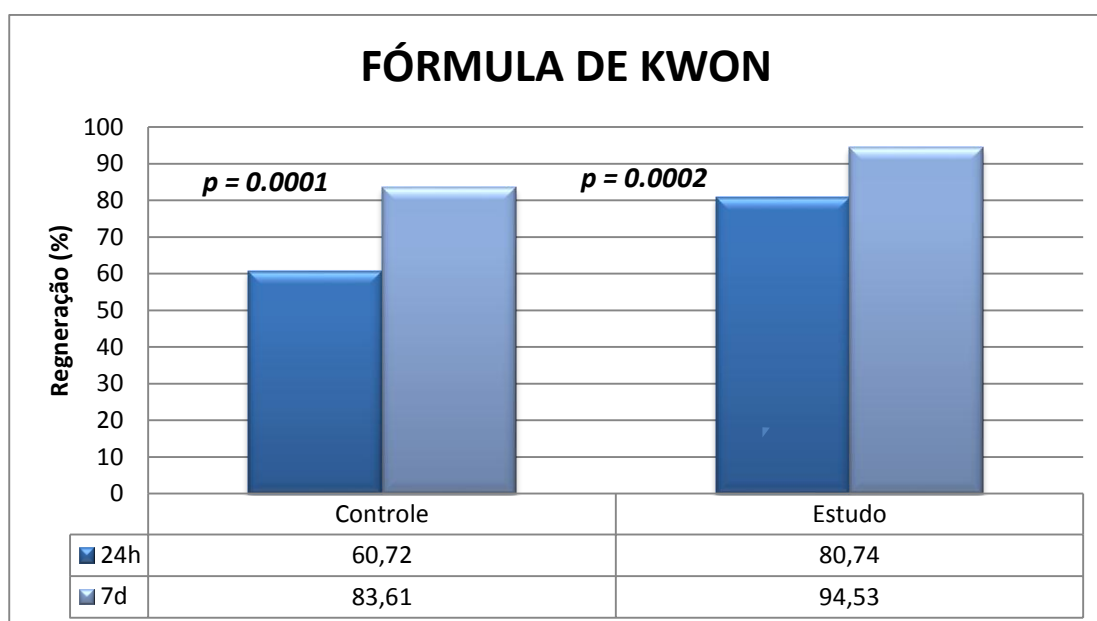


GRÁFICO 2 – AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON. COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS INTRAGRUPOS. COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS (24H x 7D) (p)

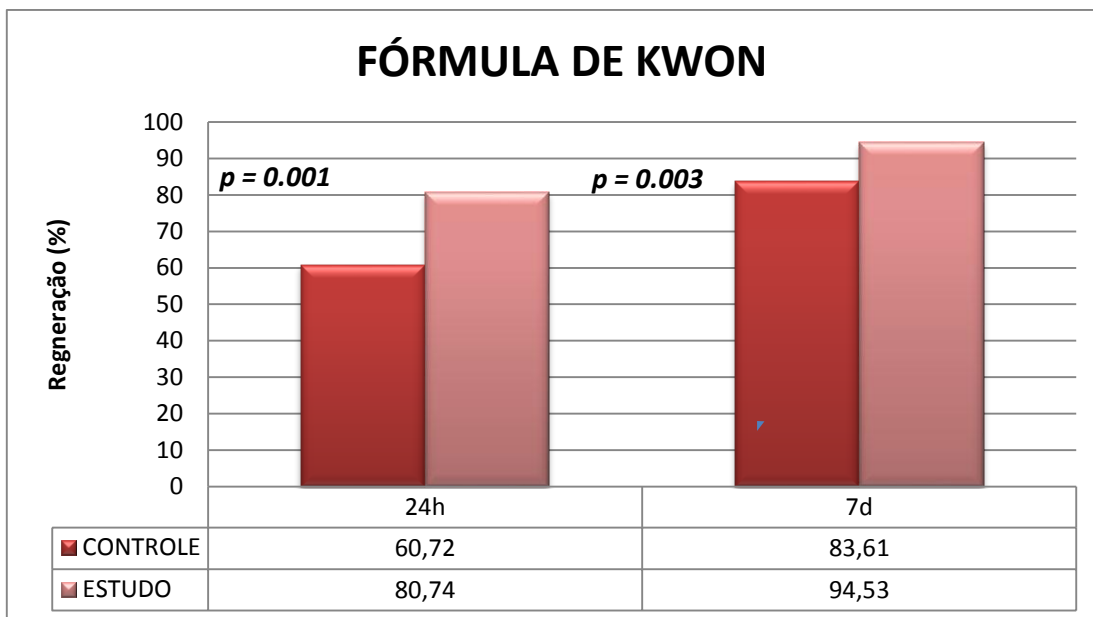


GRÁFICO 3 – AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELA FÓRMULA DE KWON. COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS INTERGRUPOS. COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS (24H x 7D) (p)

4.4 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO ÍNDICE MITÓTICO

Na avaliação do índice mitótico pela coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), a diferença estatística foi observada no grupo controle entre os dois períodos ($p=0,01$) e também no grupo de estudo entre os mesmos períodos, porém com maior diferença quando comparados intergrupos (GRÁFICO 5).

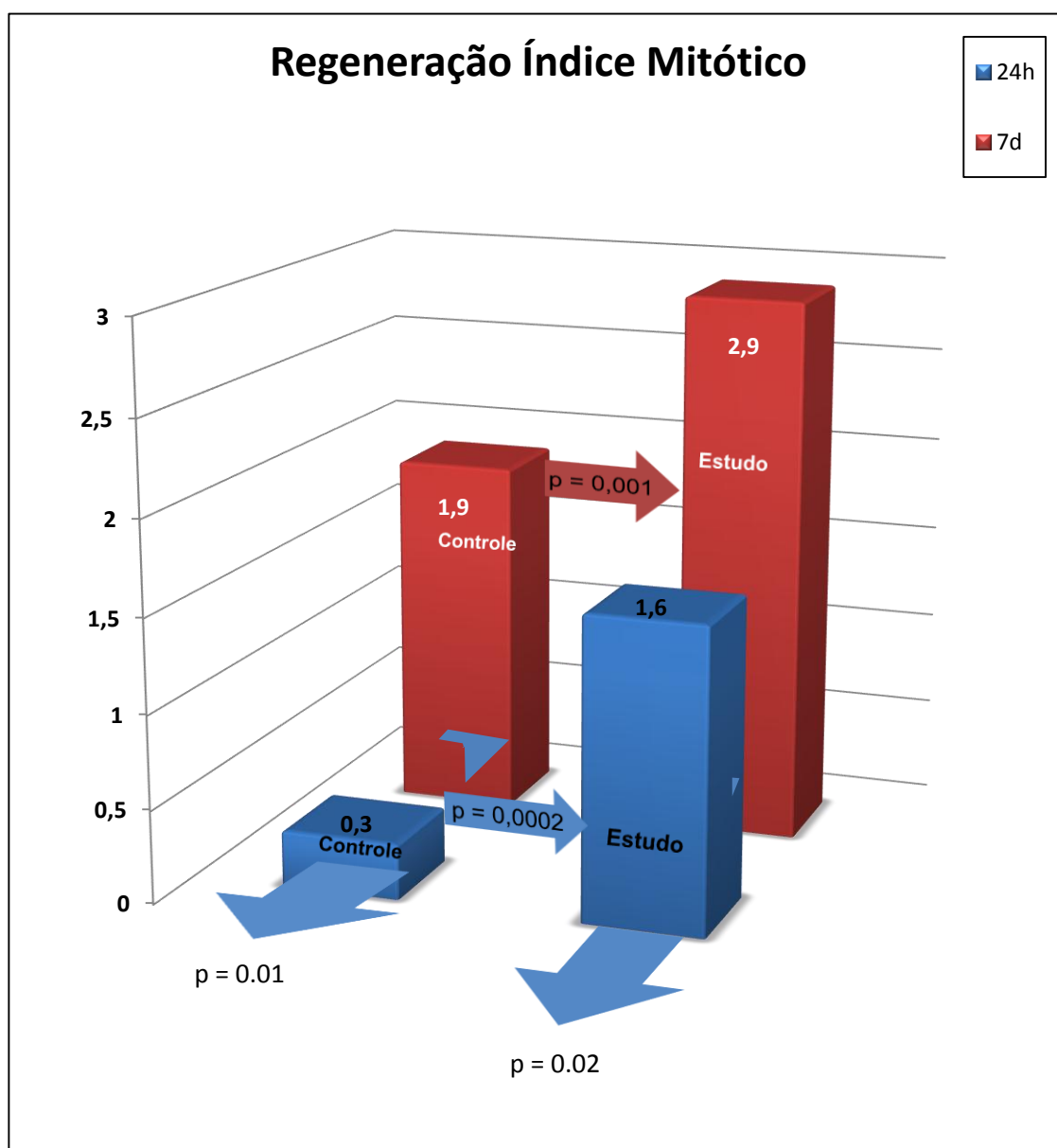


GRÁFICO 4 – AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA INTRA E INTERGRUPOS ATRAVÉS DO ÍNDICE MITÓTICO. COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS (p)

4.5 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO PCNA

Com relação ao outro anticorpo, o PCNA, observou-se diferença estatística entre os grupos controle e estudo nos dois períodos, porém sem diferença intragrupos (TABELA 4).

TABELA 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA PORCENTAGEM DO PCNA INTRA E INTERGRUPOS NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS

GRUPOS			PORCENTAGEM DO PCNA			p
			média ± dp	x	média ± dp	
Controle24horas	x	Controle 7 dias	67,4 ± 17,6	x	57,9 ± 22,2	0,20
Estudo 24 horas	x	Estudo 7 dias	80,7 ± 5,1	x	78,5 ± 18,95	0,36
Controle24horas	x	Estudo24horas	67,4 ± 17,6	x	80,7 ± 5,1	0,01
Controle 7 dias	x	Estudo 7 dias	57,9 ± 22,2	x	78,5 ± 18,95	0,01

Nota: dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística

4.6 REGENERAÇÃO HEPÁTICA PELO Ki-67

Com relação ao antígeno Ki-67, a análise estatística dentro e entre os grupos controle e de estudo nos períodos de 24 horas e 7 dias não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (Tabela 5).

TABELA 5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA PORCENTAGEM DO Ki67 INTRA E INTERGRUPOS NOS PERÍODOS 24 HORAS E 7 DIAS

GRUPOS			PORCENTAGEM DO Ki67			p
			média ± dp	x	média ± dp	
Controle24horas	x	Controle 7 dias	58,3 ± 19,8	x	44,7 ± 18,0	0,12
Estudo 24 horas	x	Estudo 7 dias	68,8 ± 10,93	x	64,8 ± 26,51	0,34
Controle24horas	x	Estudo24horas	58,3 ± 19,8	x	68,8 ± 10,93	0,07
Controle 7 dias	x	Estudo 7 dias	44,7 ± 18,0	x	64,8 ± 26,51	0,08

Nota: dp – desvio-padrão, p – nível de significância estatística

5 DISCUSSÃO

O processo de regeneração hepática constitui um complexo mecanismo de adaptação e recomposição gerado pelo dano celular hepático ocasionado por agressões físicas ou químicas. Compreende um intrincado mecanismo molecular, celular e genético auto-regulado com marcadores de iniciação e finalização que apresenta como objetivo final a reconstituição da funcionalidade hepática utilizando múltiplas vias de sinalização (FAUSTO, 2006).

O modo mais utilizado para estudo deste processo é o experimental com a realização de hepatectomia á 70% em roedores como proposta por Higgins e Anderson em 1931. Neste estudo utilizou-se ratos *Wistar* adultos, com pesos acima de 350 gramas, para determinarmos o grau de regeneração hepática estimulado pela hepatectomia parcial em animais sob ação do Imunossupressor Tacrolimus (FK506).

Já na década de 80 (FRANCAVILLA, 1989) foi demonstrada a capacidade de estímulo do Tacrolimus na regeneração hepática. A larga utilização desta droga nos esquemas de imunossupressão pós transplante hepático e o aumento do número de transplante utilizando a técnica de doador vivo ou intervivos demonstra a importância do estudo da participação do Tacrolimus na regeneração hepática.

O grupo de estudo foi submetido a pré-terapia diária com Tacrolimus através de gavagem desde o terceiro dia pré-operatório até a morte dos animais em 24 horas ou sete dias após a ressecção hepática. Utilizou-se a técnica de gavagem devido a padronização do método (PALMES, 2004).

Investigou-se a interferência do Tacrolimus no processo de regeneração hepática em ratos na dose 0,1 mg/Kg/dia, levando em consideração a variação do peso corpóreo como já demonstrado por outros autores (FRANCAVILLA, 1990a; HOOKS, 1994).

Realizou-se o controle sistemático dos pesos corporais nos 4 subgrupos assim como das massas do fígado ressecado e remanescente em relação ao peso total estimado. Observamos que todos os animais perderam peso desde o início da gavagem até a data da morte. Contudo sendo encontrada diferença estatisticamente significativa apenas intergrupos 7 dias, demonstrando a interferência do Tacrolimus neste subgrupo (Estudo 7 dias).

Com relação ao peso hepático, avaliamos e comparamos os 4 subgrupos. Foram aferidas as médias do peso do fígado ressecado, a massa restante e o peso

total do órgão no momento da hepatectomia e da morte. Ocorreu diferença significativa nos subgrupos 24 horas o que pode demonstrar o início de ação precoce do Tacrolimus no processo de cicatrização (GRANELLI-PIPERNO, 1990; LODEWWIJK, 2009).

A regeneração hepática foi avaliada pela fórmula de Kwon (KWON, 1990) para cálculo da porcentagem da regeneração no momento da morte dos animais, o índice mitótico pela coloração de hematoxilina e eosina, além da análise imunoistoquímica dos espécimes cirúrgicos com os marcadores Ki-67 e PCNA (ARISAWA, 1999).

No presente trabalho quando comparou-se os valores da regeneração pela fórmula de Kwon dentro de cada grupo, observamos aumento significativo da taxa de regeneração no grupo controle, sendo o mesmo tipo de resultado obtido com o grupo de estudo porém com um aumento ainda mais pronunciado ($p < 0,01$).

Este aumento progressivo é ocasionado por dois picos de mitoses encontrados normalmente durante o processo de regeneração. O primeiro ocorre dentro de 24 horas após a hepatectomia e é devido exclusivamente aos hepatócitos (FAUSTO, 2005).

No segundo pico de mitoses há a participação das células não-parenquimatosas, nos ratos ocorre dentro de 72 horas, sendo mais evidente nas hepatectomias maiores que 50% do parênquima e avaliadas no subgrupo 7 dias (KONIARIS, 2003).

A taxa de regeneração hepática foi avaliada também pelo índice mitótico e análise imunoistoquímica com marcadores PCNA e KI-67. O índice mitótico avalia o número de hepatócitos em processo de mitoses corados no HE com aumento de 400 vezes.

No presente estudo observou-se diferença estatística tanto inter quanto intragrupos na avaliação do índice mitótico. Estas aumentaram cronologicamente, levando-se a considerar que quanto mais tempo sob ação do Tacrolimus maior o efeito positivo na regeneração hepática, assim como demonstrado por outros autores (MAZZAFERRO, 1990; KAWANO, 1993; KAIBORI, 2001).

Alvira et al. (2002) demonstraram que a ação dos imunossupressores, em especial os inibidores da calcineurina, em porcos transplantados são dose – dependentes em relação ao efeito hepatotrófico. Sendo esta característica

reproduzida tanto nas hepatectomias quanto nos enxertos de split liver (DAHMEN, 2002).

Quando avaliou-se a regeneração hepática pelo PCNA, proteína que expressa atividade do ciclo celular (transição G1 / S), encontramos diferença estatística na avaliação intergrupos o que demonstra a facilitação da passagem das células parenquimatosas e não-parenquimatosas devido a ação do Tacrolimus.

FrancaVilla et al. (1990a) demonstrou que o Tacrolimus atua como fator de crescimento isolado facilitando a fase de priming da regeneração, além de reduzir o stress isquêmico celular (GARCIA-CRIADO, 1997) e modular a resposta inflamatória de forma positiva (GRANELLE-PIPERNO, 1990).

O Ki-67 é um antígeno nuclear expresso nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular. Seu índice (percentual de células marcadas/total de células avaliadas) é utilizado para quantificar a atividade proliferativa celular (BROWN, 2002). Em nosso estudo não encontramos diferença estatística entre os grupos. Como a proteína Ki-67 está localizada no núcleo celular, em especial no nucléolo, acreditamos que a ação do Tacrolimus em níveis genéticos necessitam de avaliação em tempo mais prolongado que 7 dias para definirmos a parcela de interferência neste mecanismo por mecanismos transcripcionais (TAUB, 1996).

Os dados do presente estudo sugerem efeito estimulatório do Tacrolimus ou FK506 do fígado em regeneração no decorrer dos 7 dias até o momento da morte dos ratos, com conseqüente perda ponderal dos animais. Valores significativos foram encontrados em todos os parâmetros utilizados para quantificar a regeneração hepática, contudo outros estudos devem ser realizados a fim de comprovar os mecanismos responsáveis por este estímulo.

Perspectivas futuras para possível aplicação das drogas imunossupressoras em contexto clínico, transplantes intervivos e *split liver*, a fim de estimular a regeneração do enxerto e restabelecer a massa hepática funcional após ressecção ou transplante.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem chegar às seguintes conclusões em ratos machos submetidos à hepatectomia parcial e sob efeito da imunossupressão com tacrolimus:

- a. Utilizando o peso corporal, pesos da massa hepática ressecada e do fígado regenerado, a porcentagem de regeneração hepática 24 horas e 7 dias após hepatectomia 70%, demonstrou-se o efeito favorável do tacrolimus sobre o modelo de regeneração hepática utilizado neste estudo;
- b. O índice mitótico observado em histologia convencional com hematoxilina e eosina 24 horas e 7 dias após a hepatectomia á 70%, demonstrou-se elevação significativa do índice mitótico em ambos os grupos entre os momentos 24 horas e 7 dias;
- c. Houve proliferação hepatocitária pelos métodos imunoistoquímicos utilizados;
- d. Dessa forma, concluí-se que o tacrolimus possui efeito estimulatório no processo de regeneração hepática desencadeado pela hepatectomia 70% em ratos *Wistar* adultos.

REFERÊNCIAS

- ARISAWA EA et al. Marcadores Biológicos: PCNA e Ki-67 Breve Revisão. **Rev Fac Odont**, 1999; v2:54-60.
- ALVIRA, L. G.; HERRERA, N.; SALAS, C.; PEREIRA, F.; HERRERA, J.; SUAREZ-MASSA, M. D.; CASTILLO-OLIVARES, J. L. Influence of cyclosporine on graft regeneration and function after liver transplantation: trial in pigs. **Transpl. Proc.**, New York, v. 34, p. 315-316, 2002.
- AURÉLIO. **Novo dicionário da lingual portuguesa**, 2a edição. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1986.
- BELGHITI J. Seven hundred forty-seven hepatectomies in the 1990s: an update to evaluate the actual risk of liver resection. **J Am Coll Surg**, 2000; 191: 48 – 46.
- BEN AR. FK506 does not increase hepatic damage due to hypoperfusion. **Hepatology**, 2000; 138 : 817-819.
- BIONDO-SIMÕES MLP et al. Effect of aging on liver regeneration in rats. **Acta Cir Bra**, 2006; 21 (4): 197- 202.
- BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki-67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 2-11, 2002.
- CHIBA T et al. Effect of an exogenous energy source and amino acids on DNA synthesis in liver. **Biochim Biophys Acta**, 1983; 755: 420.
- CLAVIEN PA. Cold ischemia decrease liver regeneration after partial liver transplantation in rat: a TNF- α /IL-6 dependent mechanism. **Hepatology**, 2002; 36: 812 – 818.
- COELHO, JCU et al. Situação atual do transplante de fígado no Brasil. **GASTRÃO 2008**; 231-240.
- COURT FG et al. The Mystery of liver regeneration. **British Jour of Surg**, 2002; 89, 1089-1095.
- CRAWFORD JM. The liver and biliary tract. In: Cotran, RS, Kumar V. (8 Ed), **Pathologic basis of disease**. W.B. Saunders, Philadelphia, 831-896.
- DAHMEN, U.; GU, Y. L.; SHEN, K.; DIRSCH, O.; LI, J.; FAN, L. M.; BROELSCH, C. E. Onset of liver regeneration after subtotal resection is inhibited by the use of new immunosuppressive drugs. **Transpl. Proc.**, New York, v. 34, p. 2312-2313, 2002.

DAS BC et al. Analysis of 100 consecutives hepatectomies: risk factors in patient with liver cirrhosis or obstructive jaundice. **World J Surg**, 2001; 25: 266-273.

DEBONERA F et al. Activation of IL-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation. **J Surg Res**, 2001; 96: 289-295.

DEBONERA F. Dexamethasone inhibits early regenerative response of rat liver after cold preservation and transplantation. **Hepatology**, 2003; 38: 1568-1572.

EZAKI, T et al. Natural history of hepatectomy regarding liver function. **HepatoGastroenterology**, 1998; 45:1795.

FARREL GC. Drugs and steatohepatitis. **Semin Liver Dis**, 2002; 22:185 -194.

FAUSTO N. Liver regeneration. **J Hepatol**, 2002; 32: 1477-1487.

FAUSTO, N et al. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. **J Hep Panc Surg**, 12: 181-189; 2005.

FAUSTO, N et al. Liver regeneration. **Hepatol**, 2006; S1: 45-56.

FRANCAVILLA A et al. Augmentation of rat liver regeneration by FK506 compared with cyclosporine. **Lancet**, 1989; 25:1248-1249.

FRANCAVILLA A. FK 506 as a growth control factor. **Transplant Proc**, New York, v. 23, p. 90-92, 1990a.

FRANCAVILLA A. Studies on mechanisms of augmentation of liver regeneration by ciclosporin and FK506. **Hepatology**, 1991a; 14: 140-143.

FRANCAVILLA A. The effects of FK 506, cyclosporine and rapamycin on liver growth in vitro and in vivo. **Transplant Proc**, New York, v. 23, p. 2817-2820, 1991b.

FRANCAVILLA A. Effects of rapamycin on cultured hepatocyte proliferation and gene expression. **Hepatology**, 1992; 15: 871-877.

FRANCAVILLA A. Augmenter of liver regeneration: its place in the universo of hepatic growth factors. **Hepatology**, 1994c; 20: 747-757.

FRIEDMAN SL. The hepatic stellate cell. **Semin Liver Dis**, 2001; 21: 307- 452.

GARCIA-CRIADO FJ. Tacrolimus down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. **Transplantation**, 1997; 64 : 594-598.

GODOY, JL et al. Regeneração Hepática : O mito de prometeu revisado. **J Bras Transpl.** 2006; 9: 535-539.

GOTO T. Discovery of FK-560, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. **Transpl Proc**, 1987; 19: 4-8.

GRANELLI-PIPERNO A. The effect of immunosuppressive agents on induction of nuclear factors that bind to sites on interleukin-2 promoter. **J Exp Med**, 1990; 172: 1869-1872.

GRISHAM JW. A morphologic study of DNA synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver. **Cancer Res**, 1962; 22:842.

HAN SY. Effect of Tacrolimus on the production of oxygen free radicals in hepatic mitochondria. **Transplant Proc**, 2006; 38 : 2242-2243.

HASHIMOTO M et al. Treatment of cirrhotic rats with epidermal growth factor and insulin accelerates liver DNA synthesis after partial hepatectomy. **J Gastroenterol Hepatol**, 1998; 13: 1259-65.

HIGGINS G, ANDERSON R. Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. **Arch Pathol.** 1931; 12:186-212.

HOLECEK M. Nutritional modulation of liver regeneration. **Nutrition**, 1999; 15 (10) 784 – 788.

HOOKS MA. Tacrolimus: a new immunosuppressant – a review of literature. **Ann Pharmacother**, 1994; 28: 501-511.

IAKOVA P et al. Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBP α growth factor. **Cell**, 2003; 113: 495.

KAIBORI M. FK 506, but not cyclosporine A, prevents mitochondrial dysfunction during hypoxia in rat hepatocytes. **Life Sci**, 2001; 69 : 17-26.

KAM I. Evidence that host size determines liver size: studies in dogs receiving orthotopic liver transplants. **Hepatology**, 1987; 7: 210-216.

KAWANO K. FK506 pre-treatment is associated with reduced levels of tumor necrosis factor and interleukin-6 following hepatic ischemia/reperfusion. **J Hepatol**, 1993; 17: 301-307.

KAWANO K. FK 506 reduces oxidative hepatic injury following cold ischemic preservation and transplantation. **Transplant Proc**, 1996; 28: 1902-1903.

KIRIMLIOGLU V et al. Effect of fish oil, olive oil, and Vitamin E on liver pathology, cell proliferation, and antioxidant defense system in rats subjected to partial hepatectomy. **Transp Proc**, 2006; 38:564-567.

KLAUNIG, JE et al. Mouse liver cell culture – hepatocyte isolation. **In Vitro**, 1981; 17: 913-925.

KONIARIS GL, et al. Liver regeneration. **Jour Am Coll Surg**, 2003; 197, 634-659.

KONTOURAS J et al. liver regeneration after hepatectomy. **Hepato-gastroenterology**, 2001; 48: 556.

KRUPCZAK – HOLLIS K. Growth hormone stimulates proliferation of old – aged regeneration liver in rats. **Hepatology**, 2004; 38: 1552-1562.

KWON, A. H.; UETSUJI, S.; YAMAMURA, M.; HIOKI, K.; YAMAMOTO, M. Effect of administration of fibronectin or aprotinin on liver regeneration after experimental hepatectomy. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 211, n. 3, p. 295-300, 1990.

LA BRECQUE d. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. **Am J Gastroenterol**, 1994; 89:86-96.

LIBERMANN TA et al. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-Kappa B transcription factor. **Mol Cell Biol**, 1990; 10: 2327.

LO CM. Minimum graft size for successful living donor liver transplantation. **Transplantation**, 1999; 68: 1112-1116.

LODEWIJK L. Effect of liver regeneration on the pharmacokinetics of immunosuppressive drugs. **Transp Proc**, 2009;41: 379-381.

MADRAHIMOV N et al. Marginal hepatectomy in the rat. **Annals of surgery**, 2006; 244: 89 – 98.

MASSON S. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology. **Stem Cell**, 2004; 22:897.

MAZZAFERRO V. Studies of the hepatotrophic qualities of FK506 and Cya. **Transp Proced**, 1990; 22: 93-95.

MEYERS, WC et al. Anatomy and Physiology. In **Sabiston Jr. DC: Text-book of Surgery**. 14th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1991, pp 976-92.

MOHAMMED FF et al. Thinking outside the cell: proteins regulate hepatocyte division. **Trends in Cell Biol**, 2005; 15: 555-563.

NAGAYAMA M. Fat emulsion in surgical patient with liver disorders. **J Surg Res**, 1989; 47:59.

NAGY P. Dexamethasone inhibits the proliferation of hepatocytes and oval cells but not bile duct cells in rat liver. **Hepatology**, 1998; 28: 423-429.

NAKACHE R. Nontoxic effect of Tacrolimus on normally perfused isolated liver and protective effect on hypoperfused liver. **Med Sci Monit**, 2007; 13: 32-39.

OKAMURA N. Enhanced liver regeneration by FK506 can be blocked by interleukin-1 alpha and interleukin-2. **Transplant Proced**, 1992; 24: 413-415.

OLTHOFF KM. Hepatic regeneration in living donor liver transplantation. **Liver Transplant**, 2003; 9: S35-S41.

PALMES D et al. Animal models of liver regeneration. **Biomaterials**, 2004; 25: 1601-1611.

PEDIADDITAKIS P. The processing and utilization of hepatocyte growth factor following partial hepatectomy in rats. **Hepatology**, 2001; 34:688-693.

PETROWISKY H et al. Second liver resection is safe and effective treatment for recurrent hepatic metastases from colorectal cancer. **Ann Surg**, 2002; 235: 863-871.

POWER C. Whither Prometheus Liver? **Ann Inter Med**. 2008; 149: 421 – 426.

SAKR MF. FK506 pre-treatment is associated with reduced levels of tumor necrosis and interleukin-6 following hepatic ischemia/reperfusion. **J Hepatol**, 1993; 17: 301-307.

SAITO S et al. A rat model of repeat 70% major hepatectomy. **Journal of Surg Research**, 2006; 134, 322-326.

SASAKI K. Protective effect of FK506 and tromboxane synthase inhibitor on ischemia-reperfusion injury in non-heart beating donor in rat orthotopic liver transplantation. **J Med Invest**, 2004; 51: 76-83.

SATO Y. FK506 suppresses class II antigen expression in regenerating livers following partial hepatectomy in the rat. **Transp Proced**, 1992; 24: 1628-1630.

SEGLIN PO. Preparation of isolated rat liver cells. **Methods Cell Biol** 1976; 13: 29-83.

SELZNER M. Failure of regeneration of the steatic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology*, 2005; 32: 35-42.

SHERLOCK S. Disease of the liver and biliary system. 7th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1985.

SHIFF ER et al. **Disease of the liver**. 8^a Ed. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1999.

SATO Y. FK506 suppresses class II antigen expression in regenerative livers following partial hepatectomy in the rat. **Transplant Proc**, 1992; 24: 1628-1630.

STARLZ TE. Liver transplantation with use of ciclosporin A and prednisone. **N Eng J Med**, 1981; 305: 266 – 269.

STARLZ TE. Liver transplantation. **N Engl J Med**, 1989. 321: 1092-1099.

STEER C, Liver regeneration. **FASEB J**, 1995; 9 1396-1400.

STREY CW et al. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. **J Exp Med**, 2003; 198: 913-923.

TAMASI V. The effect of Dexamethasone on P450 activities in regenerating rat liver. **Biochim Biophys Res Commun**, 2001; 286: 239-242.

TAMURA F, et al. FK 560 promotes liver regeneration by suppressing NK cell activity. **Gastro Hepatol**, 1998; 13, 703-708.

TANAKA N. Regulation of liver regeneration by interleukin-2 and its inhibitors: cyclosporine and FK506. **Int J Immunopharmac**, 1993; 15: 211-218.

TANIGAWA K. Augmenter of liver regeneration may promote liver regeneration by reducing natural killer cell activity in human liver diseases. **J Gastroenterol**, 2000; 35: 112-119.

TANNURI AC. Effect of the immunosuppressant on hepatocyte proliferation and apoptosis in young animal model of liver regeneration. **Pediatric Tranpl**, 2007; 1 – 7.

TAUB R. Transcriptional control of liver regeneration. **FASEB J**, 1996; 10: 413-427.

TAUB R. Liver regeneration: From myth to mechanism. **Nature reviews in Molecular Cell Biology**. 2004. 5. 836-847.

TOJIMBARA T. Cyclosporine and Tacrolimus both suppress activation of Kupffer cells in vitro. **Transp Proceed**, 1996; 28: 1381-1382.

UPADHYA GA et al. Effect of cold preservation on intracellular calcium concentration and calpain activity in rat sinusoidal endothelial cells. **Hepatology**, 2003; 37: 313-323.

URATA K et al. Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. **Hepatology**, 1997; 25: 664-671.

WEGLARZ TC, SANDGREN EP. Timing of hepatocyte entry into DNA synthesis after partial hepatectomy is cell autonomy. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2000; 97: 12595-12600.

WEIDERRECHT G. The mechanism of action FK506 and cyclosporin A. **Ann NY Acad Scie**, 1993; 696: 9-19.

WHITE P et al. Identification of transcriptional networks during liver regeneration. **J Biol Chem**, 2004; 280: 3715-3722.

VANTHIEL DM et al. Rapid growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor. **Gastroenterology**, 1987; 93: 1414 – 1419.

ZARNEGAR R et al. The many faces of hepatocyte growth factor. **J Cell Biol**, 1995; 129: 1177-1180.

ZIMMERMANN A. Liver regeneration: the emergence of new pathways. **Med Sci Monit**, 2002; 8:53-59.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 -	DADOS DOS PESOS DOS ANIMAIS NOS GRUPOS CONTROLE (C.24H E C.7D)	62
APÊNDICE 2 -	DADOS DOS PESOS DOS ESPÉCIMES NOS GRUPOS CONTROLE C.24H E C.7D)	63
APÊNDICE 3 -	DADOS DOS PESOS DOS ANIMAIS NOS GRUPOS DE ESTUDO (C.24H E C.7D)	64
APÊNDICE 4 -	DADOS DOS PESOS DOS ESPÉCIMES NOS GRUPOS DE ESTUDO (C.24H E C.7D)	65
APÊNDICE 5 -	DADOS DOS DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA NOS GRUPOS DE CONTROLE (C.24H E C.7D)	66
APÊNDICE 6 -	DADOS DOS DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA NOS GRUPOS DE ESTUDO (C.24H E C.7D)	67

APÊNDICE 1 – DADOS DOS PESOS DOS ANIMAIS NOS GRUPOS CONTROLE (C.24h e C.7d).

RATO	Peso pré-op. (g)	Peso na hepatectomia (g)	Peso na eutanásia (g)	Variação do peso (g)
C.24h 1	489,5	497	455,6	33,9
C.24h 2	445,2	426,1	420,7	24,4
C.24h 3	507,3	484,8	477,2	30,1
C.24h 4	431,8	416,8	406,1	25,7
C.24h 5	485,7	467,9	448,3	37,4
C.24h 6	493,1	471,2	447,5	45,6
C.24h 7	510,1	479,7	465,6	44,5
C.24h 8	507,1	488,5	476,3	30,8
C.24h 9	524,5	498,8	480,1	44,4
C.24h10	559,8	530,2	512	47,8
C.7d 1	483,4	464,8	439,9	43,5
C.7d 2	501,1	477,1	441,2	59,9
C.7d 3	517,4	500,5	450,8	66,6
C.7d 4	559	531,6	498,6	60,4
C.7d 5	527,8	522,5	497,1	30,7
C.7d 6	517,6	507,4	484,3	33,3
C.7d 7	549,1	536,3	506,8	42,3
C.7d 8	544,3	536,6	500	44,3
C.7d 9	534,8	523,3	496,8	38
C.7d 10	512,7	505,1	473,5	39,2

Variação do peso (g): variação entre as médias dos pesos corporais pré-operatório e na eutanásia.

APÊNDICE 2 – DADOS DOS PESOS DOS ESPÉCIMES NOS GRUPOS CONTROLE (C.24h e C.7d).

RATO	Peso do explante 70% (g)	Peso do fígado remanescente (g)	Peso total do fígado (g)	Peso do fígado na eutanásia (g)
C.24h 1	8,9	3,8	12,7	7,1
C.24h 2	7,5	3,2	10,7	6,5
C.24h 3	8,5	3,6	12,1	7,4
C.24h 4	7,2	3,1	10,3	6,4
C.24h 5	9,1	3,9	13,1	7,6
C.24h 6	9,0	3,8	12,8	7,7
C.24h 7	8,3	3,5	11,8	6,9
C.24h 8	10,1	4,3	14,5	8,3
C.24h 9	8,9	3,8	12,8	7,5
C.24h10	9,5	4,1	13,6	7,3
C.7d 1	7,5	3,2	10,7	9,9
C.7d 2	7,9	3,4	11,2	9,9
C.7d 3	7,8	3,3	11,1	8,7
C.7d 4	10,4	4,4	14,8	9,9
C.7d 5	9,5	4,1	13,6	9,8
C.7d 6	8,3	3,6	11,9	9,1
C.7d 7	10,1	4,3	14,4	10,0
C.7d 8	9,7	4,2	13,9	8,8
C.7d 9	9,1	3,9	13,0	11,0
C.7d 10	8,8	3,8	12,6	11,8

Explante 70% = Hepatectomia 70%; Fígado remanescente = 30%; Peso total = 100%

APÊNDICE 3 – DADOS DOS PESOS DOS ANIMAIS NOS **GRUPOS ESTUDO** (E.24h e E.7d).

RATO	Peso pré-op. (g)	Peso na hepatectomia (g)	Peso na eutanásia (g)	Variação do peso (g)
E.24h 1	505,0	505,0	494,0	11,0
E.24h 2	458,0	458,0	441,0	17,0
E.24h 3	452,0	452,0	429,0	23,0
E.24h 4	506,0	506,0	485,0	21,0
E.24h 5	454,0	454,0	454,0	0,0
E.24h 6	503,0	503,0	463,5	39,5
E.24h 7	493,1	493,1	469	24,1
E.24h 8	487,4	487,4	476,2	11,2
E.24h 9	504	504	492	12
E.24h10	460,2	460,2	445,2	15
E.7d 1	510,0	510,0	446,0	64
E.7d 2	424,0	424,0	362,0	62
E.7d 3	444,4	444,4	362,2	82,2
E.7d 4	519,6	519,6	456,9	62,7
E.7d 5	549,6	549,6	489,96	59,64
E.7d 6	512,0	512,0	439,0	73
E.7d 7	435,2	435,2	358	77,2
E.7d 8	487,3	487,3	446,4	40,9
E.7d 9	527,6	527,6	446,0	81,6
E.7d 10	515,5	515,5	447	68,5

Variação do peso (g): variação entre as médias dos pesos corporais pré-operatório e na eutanásia.

APÊNDICE 4 – DADOS DOS PESOS DOS ESPÉCIMES NOS **GRUPOS ESTUDO** (E.24h e E.7d).

RATO	Peso do explante 70% (g)	Peso do fígado remanescente (g)	Peso total do fígado (g)	Peso do fígado na eutanásia (g)
E.24h 1	8,55	3,66	12,21	7
E.24h 2	7,5	3,21	10,71	8,45
E.24h 3	8,04	3,44	11,48	7,93
E.24h 4	8,33	3,57	11,9	7,33
E.24h 5	8,47	3,63	12,1	7,11
E.24h 6	7,1	3,04	10,14	6,89
E.24h 7	7,8	3,34	11,14	8,26
E.24h 8	8,01	3,43	11,44	8,56
E.24h 9	8,43	3,61	12,04	6,9
E.24h10	7,8	3,34	11,14	8,63
E.7d 1	9,67	4,14	13,81	10,79
E.7d 2	7,52	3,22	10,74	7,62
E.7d 3	8,85	3,79	12,64	7,79
E.7d 4	9,34	4,00	13,34	10,71
E.7d 5	11,16	4,78	15,94	11,48
E.7d 6	9,31	3,99	13,3	10,2
E.7d 7	8,02	3,43	11,45	8,59
E.7d 8	9,12	3,90	13,02	10,93
E.7d 9	9,48	4,06	13,54	10,02
E.7d 10	9,36	4,01	13,37	10,91

Explante 70% = Hepatectomia 70%; Fígado remanescente = 30%; Peso total = 100%

APÊNDICE 5 – DADOS DOS DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA NOS **GRUPOS CONTROLE** (C.24h e C.7d).

RATO	Fórmula de Kwon (%)	Índice Mitótico – HE (células/10CGA)	Ki-67 (células positivas/100 células)	PCNA (células positivas/100 células)
C.24h 1	60,55	0	47	79
C.24h 2	61,35	0	97	61
C.24h 3	62,00	1	63	90
C.24h 4	63,82	0	71	97
C.24h 5	60,93	0	62	57
C.24h 6	62,87	0	75	54
C.24h 7	60,57	0	47	71
C.24h 8	59,12	0	27	69
C.24h 9	60,55	2	41	39
C.24h10	55,47	0	53	57
C.7d 1	96,98	3	61	71
C.7d 2	95,32	1	17	27
C.7d 3	86,88	0	39	29
C.7d 4	71,32	0	32	39
C.7d 5	75,77	5	71	87
C.7d 6	79,57	2	68	47
C.7d 7	72,86	2	38	49
C.7d 8	68,60	3	26	73
C.7d 9	89,15	1	43	76
C.7d 10	99,60	2	52	81

Fórmula de Kwon: expressa em % a regeneração; **Índice mitótico:** número de núcleos em mitose em 10 CGA; **Ki-67:** número de núcleos positivos em 100 hepatócitos registrados; **PCNA:** número de núcleos positivos em 100 hepatócitos registrados.

APÊNDICE 6 – DADOS DOS DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA NOS **GRUPOS ESTUDO** (E.24h e E.7d).

RATO	Fórmula de Kwon (%)	Índice Mitótico – HE (células/10CGA)	Ki-67 (células positivas/100 células)	PCNA (células positivas/100 células)
E.24h 1	58,58	2	54	81
E.24h 2	81,90	1	11	91
E.24h 3	72,74	0	27	17
E.24h 4	64,26	2	39	61
E.24h 5	58,76	0	18	31
E.24h 6	73,71	0	15	70
E.24h 7	77,93	3	10	51
E.24h 8	76,53	0	24	53
E.24h 9	58,69	0	19	61
E.24h10	80,05	1	78	21
E.7d 1	89,31	1	79	47
E.7d 2	83,07	1	15	68
E.7d 3	75,59	4	21	48
E.7d 4	91,28	1	47	70
E.7d 5	80,77	3	75	60
E.7d 6	89,44	2	13	27
E.7d 7	91,14	1	17	39
E.7d 8	91,57	1	14	40
E.7d 9	87,44	3	83	90
E.7d 10	94,09	6	87	90

Fórmula de Kwon: expressa em % a regeneração; **Índice mitótico:** número de núcleos em mitose em 10 CGA; **Ki-67:** número de núcleos positivos em 100 hepatócitos registrados; **PCNA:** número de núcleos positivos em 100 hepatócitos registrados.

ANEXOS

ANEXO 1-	PARECER DO COMITÉ DE ÉTICA	68
ANEXO 2-	ACOMPOSIÇÃO DA RAÇÃO BALANCEADA FORNECIDA AOS RATOS (NUVILAB CR1®)	69
ANEXO 3-	ARTIGO PUBLICADO	70

ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa



Curitiba, 26 de setembro de 2007.

Ilmo (a) Sr. (a)
Ozimo Pereira Gama Filho
Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeito do Tracolimos na regeneração hepática em ratos submetidos à hepatectomia parcial."** está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR em reunião realizada no dia 22 de agosto de 2007 e apresentou pendências. Documentos analisados, depois de atendidas as pendências, e projeto aprovado em 26 de setembro de 2007.

Registro CEP/SD: AN.008.004.07.08

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 26/03/2008.

Atenciosamente

Prof.ª. Dr.ª. Liliana Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof.ª. Dra. Liliana Maria Labronici
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP 80060-240
Fone: (41)3360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2 – COMPOSIÇÃO BÁSICA DA RAÇÃO BALANCEADA FORNECIDA AOS RATOS
(NUVILAB CR1®)

Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácidos (DL-metionina e lisina).
Umidade (máximo): 12,5%
Proteína bruta (mínimo): 22%
Cálcio (máximo): 1,4%
Fósforo (mínimo): 0,8%
Estrato etéreo (mínimo): 4%
Material mineral (máximo): 10%
Matéria fibrosa (máximo): 8%
Vitaminas: A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina.
Microelementos: ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio, cobalto.

FONTE: Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil

Imunossupressão com tacrolimus favorece a regeneração hepática induzida por hepatectomia ampla em ratos

Tacrolimus-based immunosuppression favours liver regeneration induced by extent hepatectomy in rats

OZIMO GAMA FILHO¹; EDIMAR LEANDRO TORDERKE, ACBC-PR¹; GIORGIO ALFREDO PEDROSO BARETTA, TCBC-PR¹; DANIELE GIACOMETTI SAKAMOTO²; MIGUEL ANGELO AGULHAM³; ELIZABETH MILLA TAMBARA³; JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS, ACBC-PR³

R E S U M O

Objetivo: Avaliar em dois momentos distintos da regeneração hepática a influência do Tacrolimus sobre o fenômeno da regeneração hepática desencadeada pela ressecção de 70% do parênquima hepático em ratos plenamente desenvolvidos. **Métodos:** Utilizaram-se 40 ratos *Wistar* com peso médio de 510,08 g \pm 11.66 g distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 20, cada grupo subdividido em dois subgrupos conforme o dia da morte após a hepatectomia. De acordo com o grupo os animais receberam por gavagem solução aquosa de Tacrolimus 0,1 mg/kg/dia ou solução salina no mesmo volume. Após três dias de pré-terapia todos foram submetidos à hepatectomia de 70% pela ressecção dos lobos hepáticos mediano e lateral esquerdo que foram pesados para posterior cálculo da regeneração hepática pela fórmula de Kwon. Vinte e quatro horas ou sete dias após a hepatectomia, 10 animais de cada grupo foram mortos, os fígados remanescentes (regenerados) foram pesados e amostrados para realização de índice mitótico por hematoxilina-eosina e estudo imunoistoquímico com os marcadores PCNA e Ki-67. **Resultados:** Os animais que receberam tacrolimus mostraram índice maior de regeneração hepática, atingindo significância estatística quando comparado ao subgrupo de animais mantidos com placebo quando analisados pelos parâmetros: fórmula de Kwon, índice mitótico e marcador PCNA. A tendência para o marcador Ki-67 foi idêntica aos outros parâmetros mas não alcançou significância estatística. **Conclusão:** A imunossupressão com tacrolimus possui efeito estimulatório no processo de regeneração hepática desencadeado pela hepatectomia 70% em ratos *Wistar* adultos, plenamente desenvolvidos.

Descritores: Tacrolimus. Hepatectomia. Regeneração hepática.

INTRODUÇÃO

A regeneração hepática representa o resultado de respostas fisiológicas que ocorrem após perdas de parênquima, como consequência de agressões tóxicas, medicamentosas, infecciosas, traumáticas ou cirúrgicas¹.

O fígado possui reserva funcional e capacidade regenerativa consideráveis. Porém este crescimento tecidual se constitui em um fenômeno complexo, do qual participam hormônios e substâncias presentes no soro, ou secretadas nos próprios tecidos após estímulo adequado².

Apesar de ser largamente utilizado, o termo "regeneração" é biologicamente incorreto, uma vez que a resposta induzida pelo dano tecidual hepático promove hiperplasia e hipertrofia compensatória do tecido remanescente, até o restabelecimento da massa hepática inicial. Logo os lóbulos ressecados ou destruídos não são recuperados³. Todas as células hepáticas remanescentes prolife-

ram para substituir a perda de tecido hepático e após a reestruturação do parênquima o processo regenerativo cessa³.

A cirrose é uma doença crônica do fígado decorrente de destruição e regeneração das células hepáticas, que acarreta, do ponto de vista histológico, a presença de fibrose e a transformação nodular difusa, com conseqüente desorganização das arquiteturas lobular e vascular do órgão, capaz de impor graus proibitivos de disfunção orgânica, atingindo estádios irreversíveis de insuficiência.

Em 1983 o Instituto Nacional de saúde Americana declarou o transplante hepático modalidade terapêutica aceitável clinicamente para pacientes com doença hepática terminal⁴.

Devido à relevância dos fenômenos regenerativos no fígado transplantado e a possibilidade de interferência de múltiplos fatores, quer endógenos quer exógenos, surge o interesse pela definição de que tipo de ação drogas

Trabalho realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR, como parte integrante da dissertação de Mestrado do aluno Ozimo Gama Filho no Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR- Curitiba - BR. 1. Mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná - UFPR- Curitiba - BR; 2. Patologista - Curitiba - PR-BR; 3. Professores Adjunto do Departamento de Cirurgia da UFPR; Docentes do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR-BR.